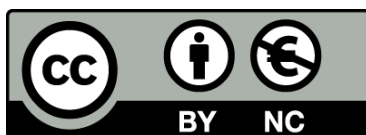




UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

ARNs no codificants petits en Limfoma de Hodgkin: regulació epigenètica de micro RNAs i importància de la via PIWI/piRNA

Anna Cordeiro Santanach



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons**.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons**.

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License**.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

TESI DOCTORAL

FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT

PROGRAMA DE DOCTORAT

MEDICINA

ARNs no codificants petits en Limfoma de Hodgkin: regulació epigenètica de microRNAs i importància de la via PIWI/piRNA

Directors de tesi

Dr. Alfons Navarro Ponz

Prof. Mariano Monzó Planella

Anna Cordeiro Santanach

Barcelona, 2016

Agraïments

Des de ben petita, sempre havia tingut força clar que “de gran” seria científica. No va ser fins que cursava el batxillerat que vaig aprofundir en el camp de la genètica i vaig veure que allò era el que m’agradava. Després vaig cursar la Llicenciatura en Biologia, ja amb la idea de dedicar-me la investigació. Un cop acabada la carrera vaig començar a introduir-me en el món de la recerca gràcies a les pràctiques del Màster en Biologia del Desenvolupament i Genètica i, posteriorment, durant els quatre anys del període pre-doctoral, que han culminat amb la realització d’aquesta tesi doctoral. És per això, que m’agradaria donar les gràcies a totes aquelles persones que ho han fet possible:

Al Marià, el Dr. Monzó, per donar-me l’oportunitat per entrar en el Laboratori d’Oncologia i Embriologia Molecular, on he treballat i après molt durant cinc anys. Pels seus consells, els “normals” i els poc ortodoxos, però sovint encertats. I també per les millors historietes i acudits que m’han explicat.

A l’Àlfonso, per donar-me l’oportunitat de treballar amb ell. Poder començar el projecte dels piwis des de zero i veure’n totes les parts, ha estat molt enriquidor. N’admiro la seva capacitat de treball i la seva motivació.

Als companys del laboratori: en Marc, pel seu sentit de l’humor; la Sandra, de qui admiro la seva traça en fer les presentacions ; la Carme, per les seves ganes de treballar; la Tània, per títar-nos un cable sempre que cal; la Rut, per lo bé que ens ho vam passar per Madrid; en Gerardo, per fer-me sentir una mica més morena i la Rosa, pels moments bons compartits al laboratori.

A la Marina, per dir les paraules adequades en el moment just. També per les visites mèdiques exprés i tots els cops que em va haver d’aguantar amb les cames enlaire.

A l’Oriol (el Dr. Becari Petit), per les converses serioses, les de ciència i les de besucs. Per ajudar-me sempre que ha calgut. Tot i que seguirem camins diferents, sempre ens quedarà el Montseny...

A en Joan, que tot i ser la última persona a entrar el grup, una de les que ha valgut més la pena de conèixer. Un tio molt treballador, enginyós, motivat i amb molt domini de les tècniques. Veure’l treballar ha set inspirador. M’ho he passat molt bé amb les converses de cuina, llibres, pelis, sèries i les *youtube-parties*.

A la Dolors, per donar-me sempre un cop de mà amb el que ha calgut. Sempre m'ha fascinat la delicadesa amb la que treballa. Hem intentat arreglar el món molts cops però encara no ens n'hem sortit, tot i que d'algunes coses n'estem més a prop que mai. També per compartir les converses sobre música, teatre, cuina i viatges.

A la Glòria, la Cristina i la Trini, les nostres secretàries. Per ocupar-se de tots els tràmits i de la paperassa perquè, com bé diu el Marià, jo com a secretària sóc un desastre i si ho hagués de fer jo no acabariem mai.

Als equips mèdics dels serveis d'Hematologia, Pneumologia, Patologia i Cirurgia de l'Hospital Cínic i del servei d'Oncologia de l'Hospital Municipal de Badalona, per recol·lectar les mostres i les dades pels nostres estudis i ajudar-nos a veure la vessant més humana de la recerca.

Als doctors Jordi Ribas, Begonya Torres, Anna Puigdemívol, Josep M^a Potau i Jose-Luis López-Negre, per compartir les hores de pràctiques, alguns dinars i els seus coneixements amb mi. Ha set un plaer poder aprendre Anatomia amb vosaltres.

A les de la Serra, tot i que hem seguit camins molt diferents i encara que durant aquests anys us hagi pogut veure molt poc, és fantàstic veure que quan ens trobem, el temps i la distància és com si no existissin.

Als de teatre, per ajudar-me a trencar la rutina del laboratori i de Barcelona. Cada cop he tingut menys temps per vosaltres però les estones que hem passat junts, fent teatre o parides diverses, seran sempre un dels millors records.

A la gent del Cor de la Universitat de Barcelona (en especial a les "Chicas del coro"), al senyor Miquel, a la Laura i a la Blanca, per posar música a la meva vida durant aquesta etapa. Sense vosaltres ni els assajos, les classes, els concerts, els ETs i els viatges això s'hauria fet molt més llarg.

A tota la gent que he conegut a Barcelona durant tot aquest temps: companys de pis i els seus amics, la gent de Cor-iolis, el "Cuerpo de baile" de l'Emanuele, i els companys de la carrera i del màster. Compartir temps amb vosaltres m'ha fet sentir una mica més com a casa en aquesta gran ciutat.

A la meva família, per donar-me una bona educació. Especialment al meu pare, per despertar-me la curiositat científica des de ben petita, i a la tieta Jus, pels cops de mà que m'ha donat des del batxillerat i fer-me sentir compresa en les coses del *mundillo* de la Biologia.

A la Universitat de Barcelona, per concedir-me la beca APIF que ha fet possible la realització d'aquesta tesi.

I, per últim, a totes aquelles persones que d'alguna manera o altra, m'han ajudat a arribar fins aquí.

Moltes gràcies

ÍNDEX

Índex

Agraïments	3
Abreviatures	13
1. Introducció	21
1.1. El Limfoma de Hodgkin.....	21
1.1.1. Descripció	21
1.1.2. Epidemiologia	21
1.1.3. Histopatologia	23
1.1.4. Limfomagènesi i origen de les cèl·lules de Hodgkin i Reed-Sternberg	25
1.1.5. Alteracions moleculars de les cèl·lules HRS	29
1.1.6. Immunofenotip del LHc.....	31
1.1.7. Paper del microambient en el LHc	33
1.1.8. Estadiatge clínic.....	37
1.1.9. Factors pronòstics	37
1.1.10. Tractaments de primera línia	39
1.2. ARNs no codificants.....	43
1.2.1. Els ARNs no codificants petits	43
1.2.2. Els microRNAs.....	44
1.2.2.1. Biogènesi dels miRNAs	44
1.2.2.2. Funcions dels miRNAs	45
1.2.2.3. Mecanismes de regulació de l'expressió dels miRNAs.....	48
1.2.2.4. miRNAs i càncer.....	51
1.2.2.5. miRNAs i LH	52
1.2.3. Els piwiRNAs	57
1.2.3.1. Les proteïnes PIWI.....	57
1.2.3.2. Els piRNAs.....	58
1.2.3.3. La biogènesi dels piRNAs.....	59
1.2.3.4. Funcions de la via PIWI/piRNAs	62
1.2.3.5. Proteïnes PIWI i càncer	64
1.2.3.6. piRNAs i càncer.....	70
2. Hipòtesis i objectius	75
2.1. Hipòtesis.....	75
2.2. Objectius	76
3. Resultats	79

3.1. Article primer: “ <i>Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma</i> ”	79
Resum.....	79
3.2. Article segon: “ <i>PiwiRNA-651 as marker of treatment response and survival in classical Hodgkin lymphoma</i> ”	91
Resum.....	91
4. Discussió	109
5. Conclusions	117
Bibliografia	121
Annexos.....	137
Annex 1. Revisions dels articles i respostes als revisors	137
Article primer	137
Article segon.....	144
Annex 2. Altres publicacions realitzades durant el període pre-doctoral.....	155
Annex 3. Treballs presentats a congressos durant el període pre-doctoral	157
Annex 4. Protocols	163
1. Extracció d’ARN de línies cel·lulars	163
2. Extracció d’ARN de ganglis	165
3. Extracció d’ARN de sèrum	167
4. Anàlisi dels nivells d’ARNm mitjançant PCR a temps real.....	169
5. Western Blot.....	171
6. Immunohistoquímica	175
7. Quantificació dels piRNAs per SYBR Green	177
8. Hibridació <i>in situ</i> amb sondes LNA pel piR-651	179
9. Extracció d’ADN de cèl·lules.....	181
10. <i>Methylation-Specific</i> PCR (MSP)	183
11. MSP <i>in situ</i>	185
12. Microfluídiques	189
13. Tractament amb 5-Aza-dC.....	191
14. Aïllament de cèl·lules B	193

ABREVIATURES

Abreviatures

5-Aza-dC: 5-Aza-2'-deoxicitidina

5mC: 5-metil-citosina

ABVD: Adriamicina, Bleomicina, Vinblastina i Dacarbazina

ADN: àcid desoxiribonucleic

ADP: adenosina difosfat

Ago3: Argonauta 3

ARN: àcid ribonucleic

ARNm: ARN missatger

Aub: Aubergine

Auto-SCT: transplantament autòleg de cèl·lules mare

BEACOPP: Bleomicina, Etoposide, Adriamicina, Ciclofosfamida, Oncovin, Procarbazina i Predisona

CD: clúster de diferenciació

Cèl·lules HRS: cèl·lules de Hodgkin i Reed-Sternberg

Cèl·lules RS: cèl·lules de Reed-Sternberg

CG: centre germinal

CM: Cel·lularitat mixta

CMH: complex major d'histocompatibilitat

CNV: variacions del número de còpies

CpG: citosina-fosfat-guanina

CSF-1: receptor del factor estimulant de colònies

DL: Depleció limfocítica

EBNA1: antigen nuclear 1 del VEB

EN: Esclerosi nodular

EORTC: *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

FBS: sèrum boví fetal

FFBS: formalin-fixed paraffin embedded, mostres incloses en parafina

GHSG: *German Hodgkin Study Group*

GM-CFS: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GRs: ganglis reactius

HDAC: complex histona desacetilasa

HLA: antigen leucocitari humà

HP1a: proteïna de la heterocromatina 1a

Hsp83: proteïna de xoc tèrmic 83

IKK: complex quinasa IκB

IPS: *International Prognostic Score*

JAK: quinasa Janus

kb: kilobase

LCK: tirosina-quinasa específica de leucòcits

LH: Limfoma de Hodgkin

LHc: Limfoma de Hodgkin clàssic

LHPLN: Limfoma de Hodgkin de predomini limfocític nodular

LINE: *long interspersed nuclear elements* (també Line1 o L1)

LLC: leucèmia limfàtica crònica

LMP2A: proteïna latent de membrana 2A

LTC: limfòcits T citotòxics

LTCs: limfòcits T citotòxics

LTR: *long terminal repeat*

m7G: 7-metil-guanina

MAT: macròfags associats al tumor

Mb: megabase (1 milió de parells de bases)

miRNA: microRNA

MOPP: Mostassa nitrogenada, Oncovin, Procarbazina i Prendisona

MOPPABV: Mostassa nitrogenada, Oncovin, Procarbazina, Prendisona, Adriamicina, Bleomicina i Vinblastina

MSP: *Methyl-Specyfic PCR*

NF-κB: factor nuclear κB

NK: cèl·lules *natural killer*

OMS: Organització Mundial de la Salut

ON: *over night* (12-16 hores)

PABP: proteïna d'unió a la cua poli-A

pb: parells de bases

PCR: reacció de la polimerasa en cadena

PD-1: proteïna de mort cel·lular programada 1

PD-L1: lligand de PD-1 1

PD-L2: lligand de PD-1 2

PE2: prostaglandina E2

PET: tomografia per emissió de positrons

piRNA: piwiRNAs

PIWI: *p element Induced in WImpi testes*

PCR: reacció en cadena de la polimerasa

PTPN2: proteïna tirosina fosfatasa, no-receptor tipus 2

Ratio M:T: ratio mediastí:tòrax

RC: resposta completa

RCB: receptor de cèl·lula B

RIP: proteïna d'interacció amb el receptor

RISC: *RNA-induced silencing complex*

RL: Ric en limfòcits

SEM: supervivència específica de malaltia

SG: supervivència global

Shu: Shutdown

SIDA: síndrome de la immunodeficiència adquirida

SINE: *short interspersed nuclear elements*

siRNA: *small interference RNA*

SLE: supervivència lliure d'event

SLM: supervivència lliure de malaltia

SLP: supervivència lliure de progressió

snoRNA: *small nucleolar RNA*

SNP: polimorfisme de nucleòtid únic

SOCS1: supressor de la senyalització de citocines

SPL: supervivència lliure de progressió

STAT: transductor de senyal i activador de la transcripció

TA: temperatura ambient (20-25°C)

TGFβ: transformin growth factor β

TH2: cèl·lula T *helper* 2

TNF: factor de necrosi tumoral

TNFR: receptor del factor de necrosi tumoral

TR: temps a la recaiguda

TRAFs: factors associats al receptor del TNF

Treg: cèl·lula T reguladora

UTR: *untranslated region*

VEB: virus d'Epstein-Barr

VIH: virus de la immunodeficiència humana

VSG: velocitat de sedimentació globular

XPO5: exportina 5

Zuc: Zucchini

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

1.1. El Limfoma de Hodgkin

1.1.1. Descripció

El limfoma de Hodgkin (LH) va ser descrit per primera vegada l'any 1832 pel metge anglès Thomas Hodgkin, en un article titulat "On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen"¹. En aquest treball es descrivia les troballes postmortem en set pacients amb un engrossiment dels ganglis limfàtics. Però no va ser fins l'any 1865 que no es va utilitzar el terme malaltia de Hodgkin, quan Samuel Wilks va confirmar les troballes anteriors i va proposar aquesta denominació². Actualment, ja que es coneix l'origen limfoide B de les cèl·lules tumorals, rep el nom de Limfoma de Hodgkin³.

Tot i que el LH es va descriure per primer cop fa més de 150 anys, la seva etiologia ha estat un enigma durant molt de temps¹. El seu tret distintiu és la presència de les cèl·lules mononucleades de Hodgkin i les multinucleades de Reed-Sternberg, descrites per primer cop l'any 1900 per Dorothy Reed i Carl Sternberg de forma independent^{4,5}.

Al ser una malaltia dels teixits limfàtics es pot iniciar a qualsevol lloc, tot i que el més freqüent és que comenci als ganglis limfàtics de la part superior del cos: caixa toràcica, coll o zona axil·lar. El LH s'escampa a través dels vasos limfàtics fins a ganglis adjacents. A les fases més avançades de la malaltia, aquesta pot envair el torrent sanguini i escampar-se a altres parts del cos, incloent el fetge, els pulmons i/o la medul·la òssia.

1.1.2. Epidemiologia

El LH representa un 1% dels càncers diagnosticats i un 10% de tots els limfomes. S'estima que durant l'any 2016, seran diagnosticats 8500 nous casos als Estats Units d'Amèrica. La seva incidència presenta una distribució bimodal amb un pic en joves de 15-35 anys i un segon pic menys important en persones majors de 50 anys (figura 1). És lleugerament més prevalent en homes que en dones (3:2,3)⁶.

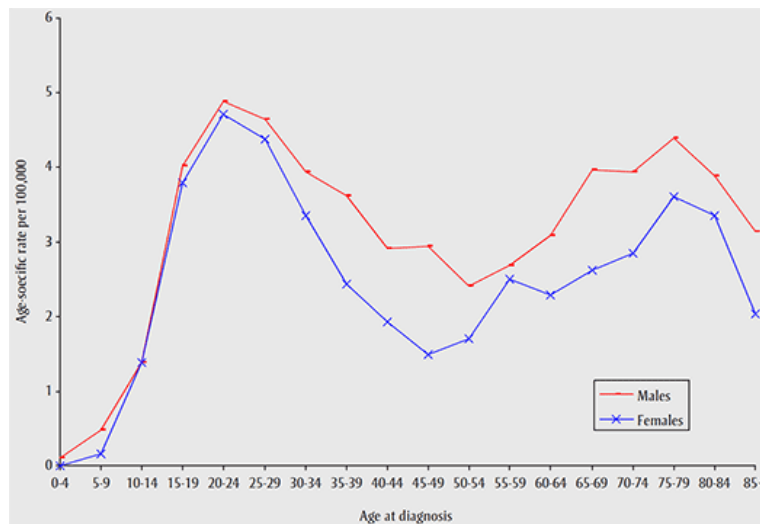


Figura 1. Incidència del LH específica per grups d'edat i sexe a Canadà entre els anys 2003 i 2007
(Agència de Salut Pública del Canadà, www.publichealth.gc.ca)

Hi ha molts factors etiològics associats a l'aparició del LH. Aquests són els més rellevants:

- **Genètica:** Certs antígens del sistema d'antígens leucocitaris humans (HLA) són més freqüents en LH. En bessons monozigòtics, hi ha un 99% més de possibilitats que un d'ells desenvolupi la malaltia si l'altre l'ha contret. S'ha suggerit un model de transmissió hereditària autosòmica recessiva amb el 60% dels casos lligat a un gen del HLA i un 40% degut a altres factors.
- **Virus d'Epstein-Barr (VEB):** Entre un 40 i un 60% dels pacients de LH clàssic (LHc) estan afectats per la presència del VEB, però varia segons la localització geogràfica, edat, sexe, estadi clínic i subtipus histològic⁷.
- **Alteracions del sistema immunitari:** S'ha descrit un risc superior de desenvolupar LH en receptors de transplantament al·logènic de medul·la òssia, suggerint una relació entre l'estimulació de les cèl·lules immunitàries, l'exposició al VEB i el LH⁸. Els trastorns de la immunitat, com la immunosupressió, poden causar el LH. S'ha observat que pacients seropositius pel virus de la immunodeficiència humana (VIH) i els que presenten el síndrome de la immunodeficiència adquirida (SIDA) tenen un risc molt més elevat de desenvolupar la malaltia. A més, els pacients amb LH lligat al VIH presenten subtipus histològics més agressius, estadis més avançats i pitjor pronòstic⁹.

1.1.3. Histopatologia

El LH és una neoplàsia que s'origina als limfòcits B, però en un 5-15% dels casos també pot estar originada als limfòcits T¹⁰. La seva característica més rellevant és que les cèl·lules tumorals només estan en una proporció de l'1% dins del gangli i estan envoltades per un microambient reactiu format majoritàriament per eosinòfils, neutròfils, cèl·lules plasmàtiques, histiòcits, fibroblasts i cèl·lules estromals¹¹. Les cèl·lules tumorals reben el nom de cèl·lules de Hodgkin i Reed-Sternberg (HRS). Es caracteritzen per ser cèl·lules grans (30-50 µm), multinucleades o amb un nucli bilobat amb nuclèols eosinofílics, que recorden als ulls d'una òliba.

La seva presència és necessària per al diagnòstic del LH. Les podem trobar en diferents variants (figura 2):

- **Cèl·lules de Reed-Sternberg (RS) lacunars:** cèl·lula gran amb un nucli gran hiperlobulat, amb múltiples nuclèols petits i citoplasma eosinofílic que es retrau al voltant del nucli deixant un espai lliure (llacuna).
- **Cèl·lules RS pleomòrfiques:** disposen de múltiples nuclis irregulars.
- **Cèl·lules RS tipus "crispeta" (variant limfohistiocítica):** cèl·lula petita amb un nucli molt lobulat amb nuclèols petits. Rep aquest nom perquè la seva forma recorda a la d'una crispeta.
- **Cèl·lules de Hodgkin:** cèl·lula RS atípica i mononucleada.
- **Cèl·lules momificades:** tenen el nucli compacte, no tenen nuclèol i el citoplasma és basofílic.

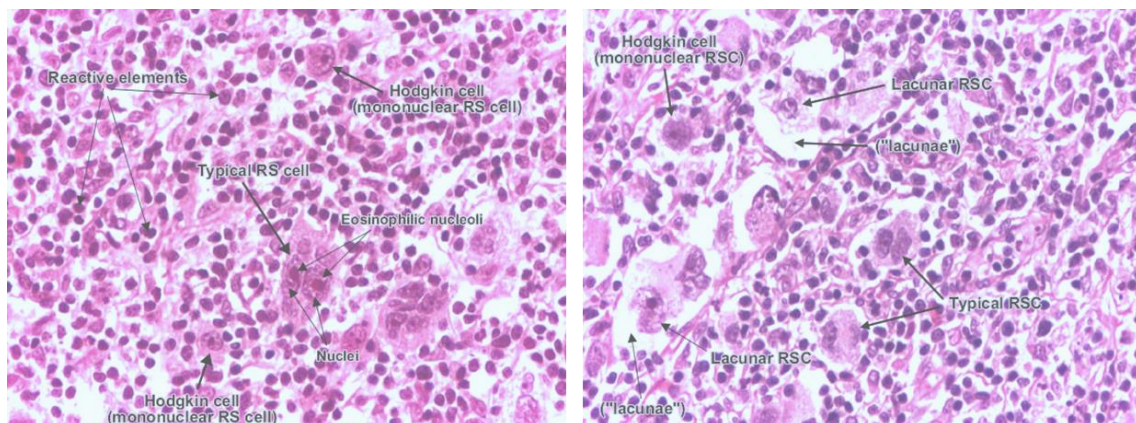


Figura 2. Exemples de diferents tipus de cèl·lules HRS (www.pathologyatlas.ro)

Segons la Organització Mundial de la Salut (OMS), podem classificar el LH en dos grans grups segons la seva histologia³:

- **LH de predomini limfocític nodular (LHPLN) o paraganuloma:** representa només un 5% dels casos diagnosticats. Les cèl·lules HRS típiques són poc freqüents o absents. Hi ha cèl·lules “crispeta” en un microambient amb molta presència de cèl·lules inflammatòries, principalment limfòcits. És poc agressiu i té molt bon pronòstic.

- **LHc:** representa un 95% dels casos diagnosticats. Es caracteritza per la presència de cèl·lules HRS. Dins d'aquest grup podem definir quatre subtipus (figura 3):
 - **Esclerosi nodular (EN):** és el subtipus més freqüent en països desenvolupats (60-80%). És més freqüent en la població jove i afecta homes i dones per iguals caracteritza per la presència de cèl·lules lacunars i bandes de col·lagen rodejant almenys un dels nòduls.
 - **Cel·lularitat mixta (CM):** representa el 15-30% dels casos i té més incidència en el grup de més de 45 anys. Presenta una barreja heterogènia de cèl·lules de Hodgkin, limfòcits petits, eosinòfils, neutròfils, histiòcits epiteloïdes i no-epiteloïdes, cèl·lules plasmàtiques i fibroblasts. És el subtipus que sol anar més acompanyat per la infecció del VEB.
 - **Ric en limfòcits (RL):** representa un 5% dels casos. Les cèl·lules HRS són relativament rares i el microambient està dominat per limfòcits petits madurs, amb pocs o sense eosinòfils. És el subgrup de LHc que presenta millor pronòstic.
 - **Depleció limfocítica (DL):** representa menys d'un 1% dels casos. És més comú en gent gran i en pacients portadors del virus de la immunodeficiència humana (VIH). El seu infiltrat és escàs¹².

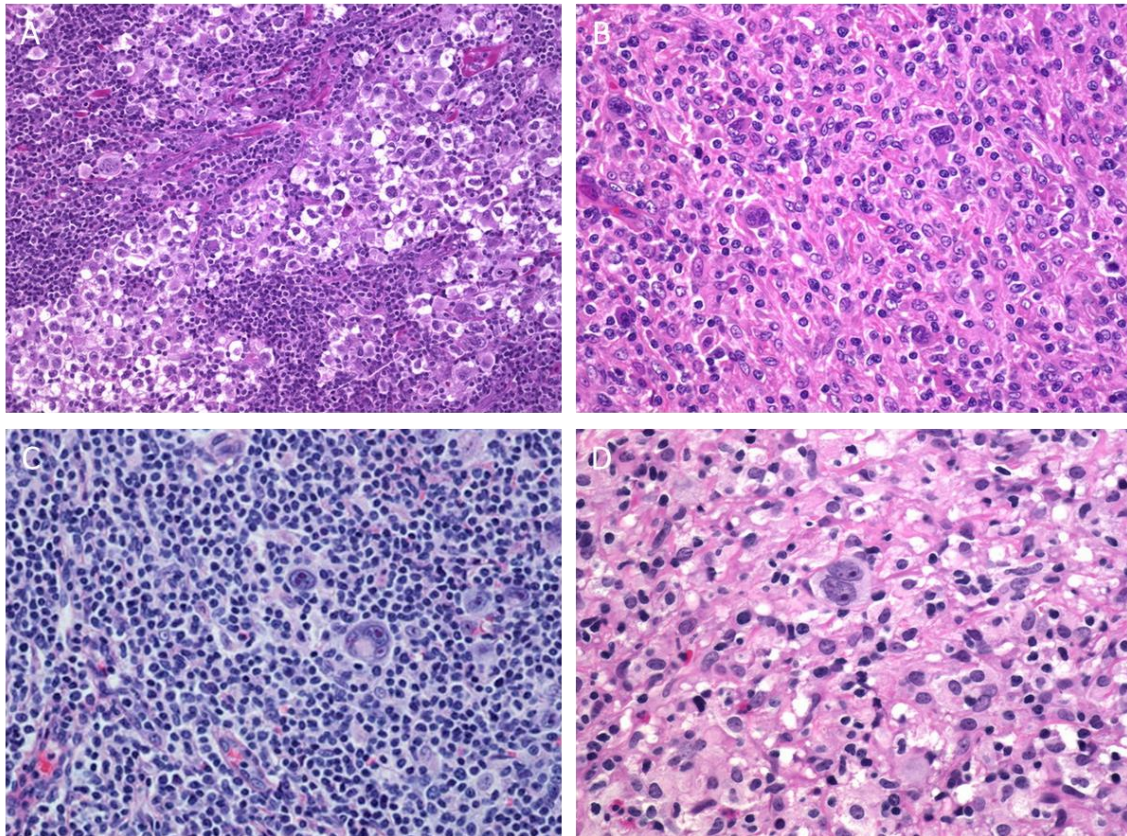


Figura 3. Micrografies dels subtipus histològics de LHc. A, EN; B, CM; C, RL; D, DL
(A, B i D de www.webpathology.com i C de www.pedsoncologyeducation.com)

1.1.4. Limfomagènesi i origen de les cèl·lules de Hodgkin i Reed-Sternberg

Dins dels ganglis limfàtics, trobem els centres germinals (CG), que són les estructures histològiques que s'encarreguen de la generació i de la selecció de les cèl·lules B que produeixen anticossos d'alta afinitat. De fet, les cèl·lules B del centre germinal representen el teixit normal de la majoria dels limfomes de cèl·lula B madura, com el LH¹³. Els CGs tenen una zona fosca, que bàsicament conté cèl·lules B amb una taxa de proliferació molt elevada que passen pel procés d'hipermutació somàtica de les immunoglobulines, i una zona clara, on les cèl·lules B són seleccionades en base a la seva afinitat per l'antigen i finalment es diferencien en cèl·lules B memòria o en cèl·lules plasmàtiques. El pas entre les dues zones està controlat per programes transcripcionals específics, que acostumen a estar afectats per alteracions genètiques que poden causar la malignització de les cèl·lules B. Si un limfòcit conté anticossos de baixa afinitat o que reaccionen contra el propi cos, aquesta cèl·lula entrarà en apoptosi i serà fagocitada pels macròfags¹³ (figura 4). S'ha vist que les cèl·lules HRS deriven de cèl·lules que contenen errors (*crippling mutations*) en el receptor de la cèl·lula B (RCB) produïts

durant la hipermutació somàtica però que aconsegueixen escapar de l'apoptosi¹⁴. Per poder-ho fer, perden molts dels marcadors característics de les cèl·lules B i n'adquireixen d'altres.

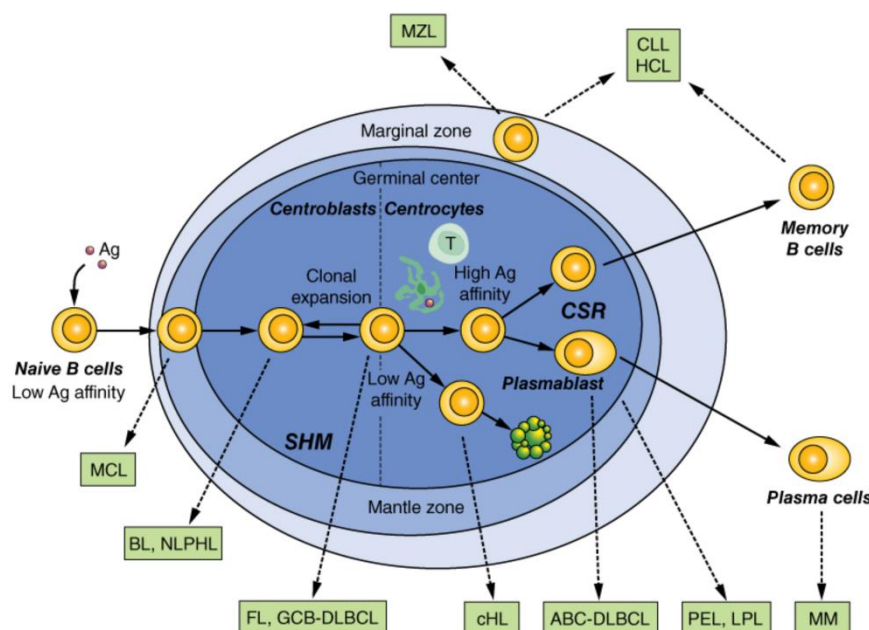


Figura 4. Esquema del procés de la limfomagenèsi

(DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles&Practice of Oncology, 10th edition, 2015)

Avui en dia, es sap que el LH és una malaltia d'origen clonal, però l'origen de les cèl·lules HRS va ser molt difícil d'interpretar ja que aquestes tenen un immunofenotip diferent al de qualsevol cèl·lula del sistema hematopoètic, amb l'expressió de marcadors de diferents llinatges. Tot i així, aquestes cèl·lules tenen reordenaments i mutacions somàtiques de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines pràcticament en tots els casos. Curiosament, en una quarta part dels casos, es van trobar mutacions somàtiques destructives en les cadenes lleugeres. Aquestes mutacions tenen lloc als CGs, però normalment causen la mort de la cèl·lula que les conté. Això indica que en aquests casos les cèl·lules HRS deriven de cèl·lules B pre-apoptòtiques dels centres germinals. És possible que les cèl·lules HRS, en general, s'originin als CGs on han adquirit mutacions desfavorables i siguin susceptibles d'entrar en apoptosi, ja que només una fracció de les mutacions desfavorables es poden identificar per seqüenciació. Per exemple, les mutacions per substitució que causen una afinitat més baixa pel RCB, no són fàcilment detectables, però segurament són la major causa d'inducció a l'apoptosi als CGs. Tot i així, els reordenaments de les immunoglobulines també s'han trobat en cèl·lules T i en neoplàsies mieloides, s'ha qüestionat si la detecció de reordenaments ens les cèl·lules HRS prova el seu origen B¹⁵. Hi ha més evidències que mostren inequívocament l'origen B de les cèl·lules HRS:

- Els reordenaments complets de les cadenes pesades i lleugeres només es troben a les cèl·lules B¹⁶.
- Les mutacions somàtiques només tenen lloc en les cèl·lules B activades pel contacte amb un antigen, i les mutacions somàtiques en el reordenament de les immunoglobulines de les cèl·lules HRS són, almenys inicialment, seleccionades per la seva funcionalitat, que només passa si la cèl·lula expressa el (RCB)^{14,17}.
- Les línies cel·lulars de LH han patit el canvi de classe de les immunoglobulines, un procés que només té lloc en les cèl·lules B activades per antigen, i hi ha indicacions que les cèl·lules HRS primàries també han patit recombinacions de canvi de classe^{18,19}.
- Els limfomes compostos per un LH i un limfoma de cèl·lula B madura, freqüentment estan relacionats clonalment i contenen reordenaments de les immunoglobulines comuns i mutacions diferents, demostrant que tots dos limfomes deriven d'un precursor comú: una cèl·lula madura del CG^{20,21}.

Pel què fa al seu curiós aspecte, dos estudis recents han tret a la llum l'origen de les cèl·lules HRS gegants. Mitjançant el seguiment en vídeo de diverses mitosis individuals de diferents línies cel·lulars de HL es va veure que, la major part d'aquestes cèl·lules gravades, es dividien al cap de 25 hores, aproximadament un 20% morien i un 4-9% (segons la línia cel·lular) es mantenien en un estat de quiescència, és a dir, ni es dividien ni entraven en apoptosi. A més, aquestes cèl·lules quiescents mostraven un temps de vida més llarg (25-30 vs 89-112 hores) i un diàmetre més gran (27-31 vs 100 µm) que les cèl·lules que es dividien. La refusió de cèl·lules filles és la via predominant de formació de les cèl·lules HRS gegants (70% dels casos). Aquest procés té lloc en dues etapes: en primer lloc, una cèl·lula petita de Hodgkin es divideix donant lloc a dues cèl·lules filles que, al cap d'unes hores, es fusionen donant lloc a una cèl·lula HRS fusionada gegant. Mitjançant el marcatge amb una proteïna fluorescent es va poder observar que les dues cèl·lules filles contenen un nucli intacte abans de la refusió, de manera que un cop fusionades, les cèl·lules gegants tindran dos nuclis separats. Gràcies al marcatge de l'actina del citoesquelet cel·lular es va poder observar que les cèl·lules filles no es dividien del tot, sinó que hi havia una citocinesi incompleta, i les cèl·lules filles encara estaven connectades abans de la refusió (figures 5-7).

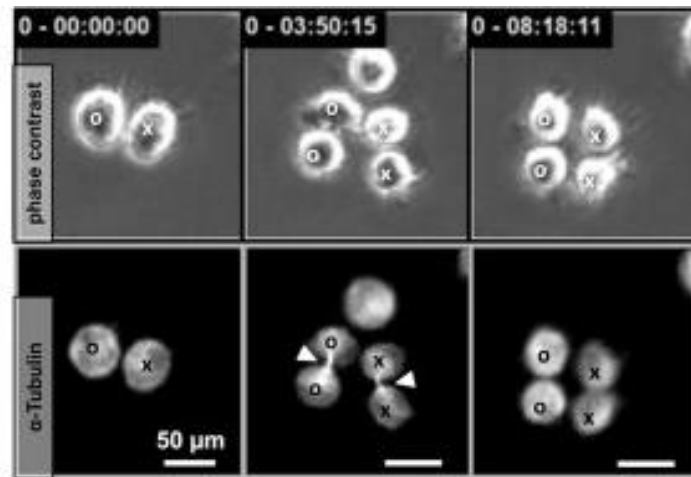


Figura 5. Detall de dues citocinesis incompletes, indicades amb puntes de fletxa (adaptat de Rengstl i cols., PNAS, 2013)

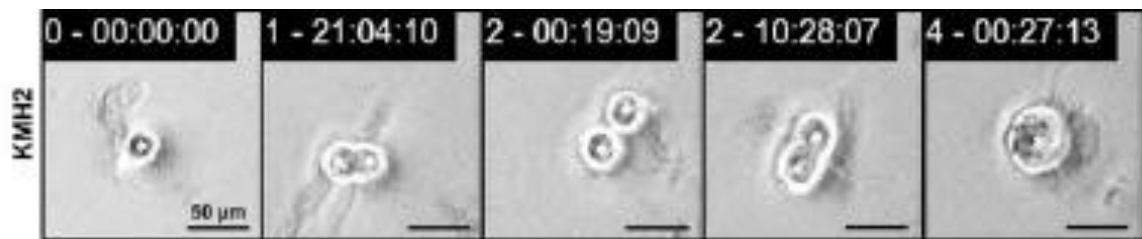


Figura 6. Procés de formació complet d'una cèl·lula RS (adaptat de Rengstl i cols., PNAS, 2013)

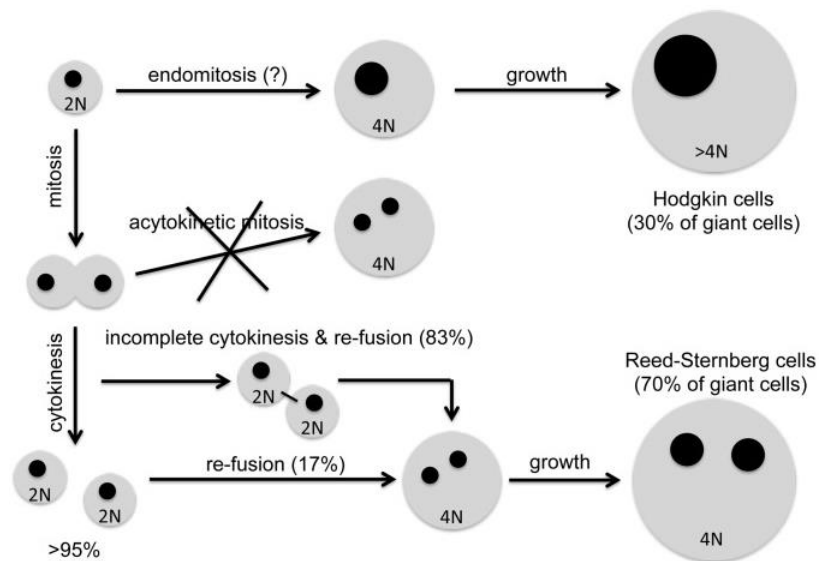


Figura 7. Esquema de la generació de les cèl·lules gegants HRS (Rengstl i cols., Commun Integr Biol., 2014)

En el 30% dels casos restants, les cèl·lules gegants es formen sense una fusió prèvia, per això, aquestes cèl·lules reben el nom de cèl·lules HRS gegants induïdes per creixement. De vegades, sembla que la massa nuclear augmenti però sense esdevenir multinuclears, cosa que suggereix que aquest fenomen pugui estar degut a endomitosi^{22,23} (figura 7).

1.1.5. Alteracions moleculars de les cèl·lules HRS

Les cèl·lules HRS presenten alteracions de les principals vies de senyalització cel·lulars: NF- κ B, JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK/ERK i Notch1¹⁵. A continuació veurem les dues vies principals implicades en la patogènesi del LH.

La via del **factor nuclear κ B (NF- κ B)** està implicada en la resposta cel·lular a estímuls com l'estrès, les citocines, la radiació ultraviolada, les LDL-oxidases i antígens bacterians o virals. També juga un paper clau en la resposta immunitària. La seva desregulació es relaciona amb el càncer o el desenvolupament de malalties autoimmunes, entre d'altres²⁴.

En mamífers, la família NF- κ B està composta per cinc factors de transcripció: p50, p52, RelA (p65), c-Rel i RelB. Aquests factors de transcripció comparteixen una homologia de 300 pb al domini N-terminal de unió a l'ADN i de dimerització. Aquest serveix de plataforma per formar homodímers i heterodímers amb membres de la família, permetent-los unir-se als promotors i modular l'expressió gènica. Les proteïnes NF- κ B no es sintetitzen *de novo* sinó que la seva activitat transcripcional està silenciada per interaccions amb les proteïnes inhibidores I κ B presents al citoplasma. Aquesta família consta de set membres: I κ B α , I κ B β , Bcl-3, I κ B ϵ , I κ B γ i les proteïnes precursors p100 i p105.

La via NF- κ B es pot activar per dues vies, conegudes com la via clàssica (canònica) i la via alternativa (no-canònica). El pas comú de les dues cascades és l'activació del complex quinasa I κ B (IKK), que consta de subunitats catalítiques (IKK α i/o IKK β) i de la proteïna reguladora no-enzimàtica NEMO o IKK γ ²⁵.

Les cèl·lules HRS tenen activades ambdues vies de NF- κ B, que probablement és el major mecanisme patogènic del LH. En la via clàssica, l'activació de diversos receptors estimula TRAFs (factors associats al receptor del factor de necrosi tumoral (TNF)), que s'associen amb la proteïna d'interacció amb el receptor (RIP), que activa l'inhibidor de NF- κ B IKK que fosforila I κ B α i I κ B β . Això marca aquestes proteïnes per ubiquitinització per la seva degradació al proteosoma, alliberant els dímers de NF- κ B (p50-p65 i p50-REL) permetent la seva

translocació al nucli. La transducció del senyal des de la superfície cel·lular fins al complex IKK pot ser inhibida per la proteïna induïda per $\text{TNF}\alpha$ 3 (TNFAIP3), que treu les ubiquïtines activadores de RIP i TRAFs i afegeix ubiquïtines en aquestes molècules per marcar-les per degradació al proteosoma. En la via alternativa, l'activació del receptor porta a l'estimulació de la quinasa NIK (MAPK3K14), que després activa el complex IKK α (que pot activar també a la via clàssica). IKK α activa processa els precursors p100 en molècules madures de p52, que es transloquen com dímers actius p52-RELB al nucli (figura 8).

L'activitat de la via NF- κ B en les cèl·lules HRS pot estar mediada per diversos mecanismes: senyalització a través dels receptors CD40, RANK, BCMA, i TACI, amplificació genòmica de REL, mutacions destructives de IKBA i IKBE i senyalització a través de la proteïna LMP1 del VEB. També s'ha vist que el CD30 i el seu lligand, CD-30L, també poden activar la via. Majoritàriament en pacients no infectats pel VEB, s'ha vist que hi poden haver mutacions inactivadores de TNFAIP3¹⁵ (figura 8).

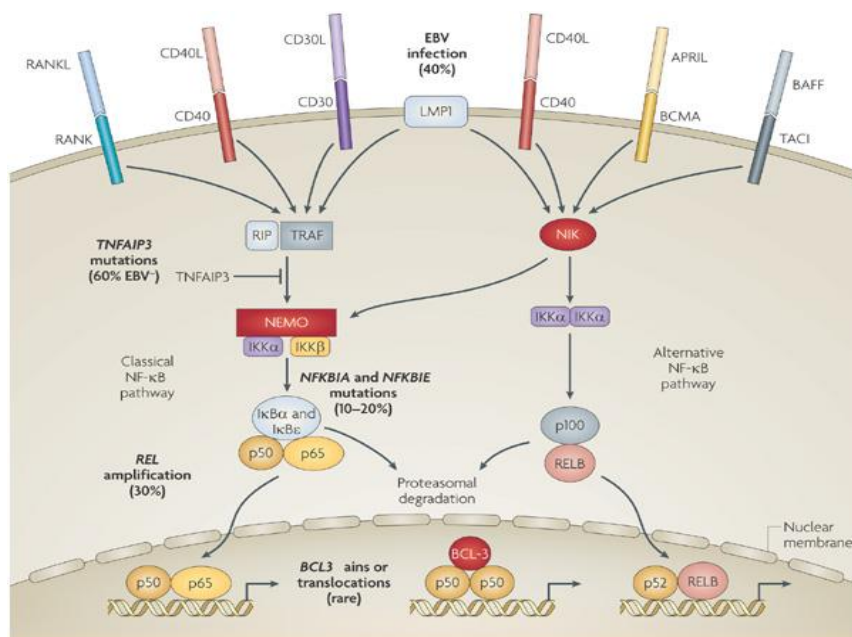


Figura 8. Esquema de la via NF- κ B (Küppers R, *Nature Reviews Cancer*, 2009)

La via de la **quinada Janus/transductor de senyal i activador de la transcripció (JAK/STAT)** transmet informació senyals rebuts a través de receptors transmembrana, directament cap al nucli, proveint un mecanisme de regulació transcripcional sense segons missatgers. En mamífers, hi ha quatre proteïnes JAK (1, 2, 3 i TYK2) i set gens STAT (1, 2, 3, 4,

5A, 5B i 6). Aquesta via està regulada per un ampli ventall d'estímuls intrínsecs o ambientals, que confereixen plasticitat a la resposta d'una cèl·lula o teixit²⁶.

Aquesta via s'inicia amb la unió d'una citocina amb el seu receptor corresponent, que està inactiu. Aquesta unió provoca un canvi que indueix la dimerització del receptor. Les proteïnes JAK que estan unides als receptors esdevenen actives i es fosforilen de forma creuada. Aquest fet genera llocs d'unió per les proteïnes STAT, que homodimeritzen i es transloquen al nucli on actuaran com a factors de transcripció²⁶ (figura 9).

A més, la via JAK/STAT pot tenir un paper rellevant en la patogènesi del LH ja que el locus de JAK2 està amplificat en el 30% dels pacients, donant suport a que la seva expressió pot ser oncogènica. També s'han descrit mutacions de pèrdua de funció de SOCS1 (supressor de la senyalització de citocines 1) i delecions de PTPN2, que porten a l'activació constitutiva de la via JAK/STAT²⁷.

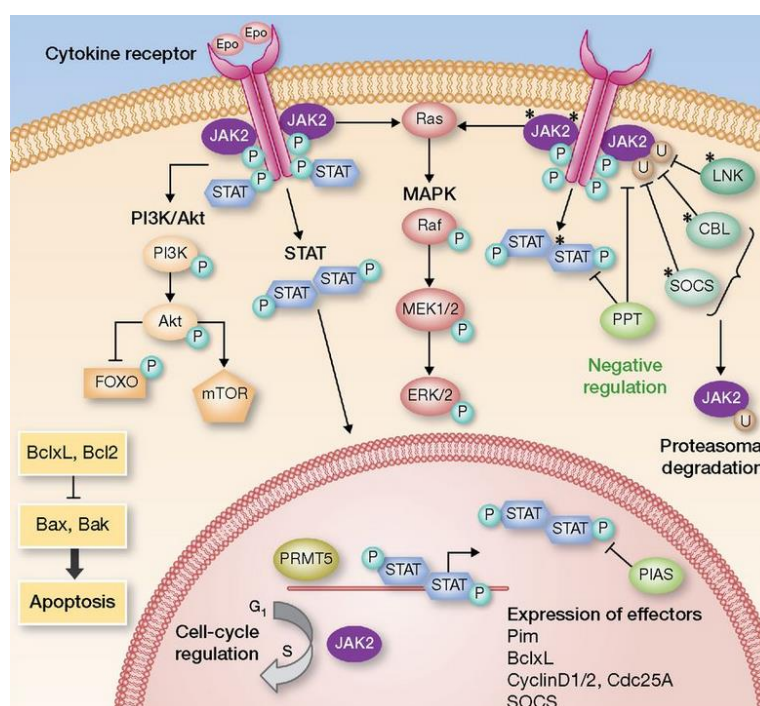


Figura 9. Esquema de la via JAK/STAT (adaptada de Meyer i Levine, Clinical Cancer Research, 2014)

1.1.6. Immunofenotip del LHc

El diagnòstic del LH requereix la identificació morfològica de les cèl·lules HRS en el seu microambient. Aquest diagnòstic es sol confirmar per la detecció immunohistoquímica de CD15 i CD30 i per l'absència de CD20, CD3 i CD45 en les cèl·lules HRS.

Diferents estudis mostren la pèrdua de varis marcadors de cèl·lula B²⁸. Alguns d'ells són factors de transcripció de gens específics de cèl·lula B, com Oct-2, Bob1 i Pu.1 que es troben silenciats per mecanismes epigenètics, com ara la metilació de l'ADN²⁹. Entre els gens que no s'expressen, hi trobem components del RCB (Blk, Syk, SLP-65), factors de transcripció (Pu.1, A-myb, Spi-B) i marcadors de superfície (CD37 i CD53). Tot i així, alguns dels marcadors del llinatge B es conserven com els factors importants per a la presentació d'antigen (CD40, CD80, CD86, complex major d'histocompatibilitat (CMH) de classe II) i el factor de transcripció Pax-5³⁰.

A part de perdre molècules típiques del llinatge B, les cèl·lules HRS expressen sovint marcadors d'altres llinatges hematopoètics com marcadors de cèl·lules T en alguns dels casos (CD3 i CD4), molècules citotòxiques (granzim B), marcadors de cèl·lula dendrítica (fascina i CCL17) o marcadors mieloides (receptor del factor estimulant de colònies 1 (CSF1) i α 1-antitripsina)¹⁵.

Fromm i cols. van dissenyar un estudi per identificar cèl·lules HRS per citometria de flux utilitzant nou marcadors diferents (figura 10). Les cèl·lules HRS havien de tenir un fenotip semblant al que es veu als anàlisis immunohistoquímics en seccions de teixit, CD5-, CD15+/-, CD20-, CD30+, CD40 intens, CD45+ lleu, CD64-, CD71+ i CD95+ intens. Amb aquest marcadors (taula 1) es va aconseguir una sensibilitat del 88.7% i una especificitat del 100% en 279 suspensions de ganglis limfàtics analitzades a cegues³¹.

Taula 1. Marcadors utilitzats en l'estudi de Fromm i cols. per identificar cèl·lules HRS mitjançant citometria de flux

Nom molècula	Lloc d'expressió habitual	Expressió a les cèl·lules HRS
CD95	Cèl·lules apoptòtiques	+
CD64	Macròfags	-
CD30	Cèl·lules B i T activades	+
CD45	Cèl·lules mare hematopoètiques i leucòcits	Expressió lleu
CD40	Cèl·lules presentadores d'antigen	+
CD20	Cèl·lules B	Expressió lleu
CD15	Neutròfils	75-85% dels casos
CD71	Precursors d'eritròcits	-
CD5	Cèl·lules T i un subgrup de cèl·lules B secretores d'IgM	+/-

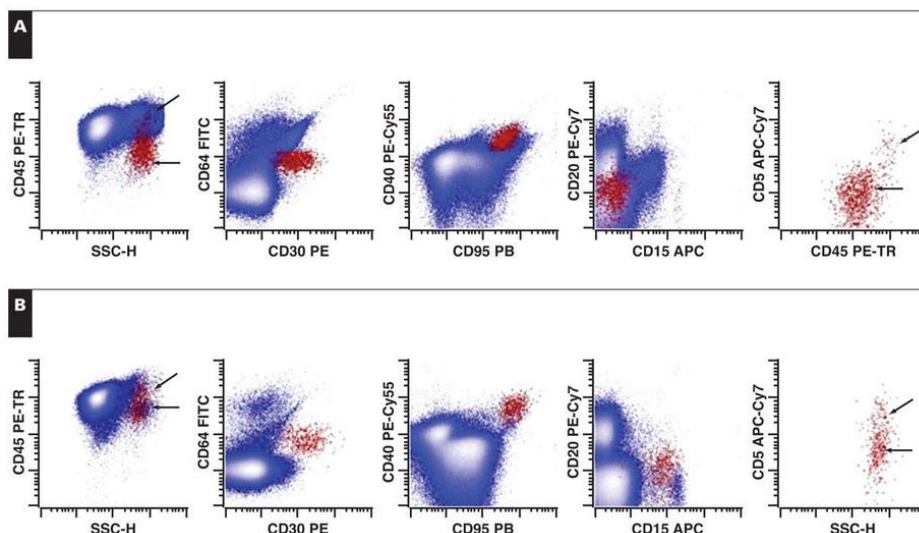


Figura 10. *Scatter plots* de la citometria de flux per identificar cèl·lules HRS de dos pacients diferents (A i B). La última imatge de cada fila mostra la població de cèl·lules HRS aïllades. Les cèl·lules HRS estan marcades en vermell i les del microambient, en blau. Les fletxes obliques representen les cèl·lules amb roseta i les horitzontals, les que no en formen. (adaptada de Fromm i cols., American Journal of Clinical Pathology, 2009)

1.1.7. Paper del microambient en el LHc

El LH és un tipus de càncer únic ja que les cèl·lules tumorals es presenten en molta inferioritat numèrica. Les cèl·lules HRS expressen molècules de comunicació, les citocines i quimiocines (citocines amb capacitat de quimiotaxi) que manipulen la resposta immunitària del pacient i les cèl·lules del microambient perquè no ataquin a les cèl·lules tumorals. Les citocines són molècules de baix pes molecular que actuen de manera paracrina (afectant a les cèl·lules veïnes per emissió de senyals químiques) o autocrina (afectant a la pròpia cèl·lula secretora). Sobretot contribueixen a la proliferació i al fenotip antiapoptòtic de les cèl·lules HRS³².

S'ha vist que el reclutament de cèl·lules inflammatòries és essencial per a la supervivència de les cèl·lules HRS així com també que aquestes són dependents dels senyals de supervivència que els arriben des del microambient (figura 11). Els següents fets ho evidencien³²:

- Dificultat de fer créixer les cèl·lules HRS en cultiu
- Les cèl·lules HRS no s'acostumen a trobar en sang perifèrica
- Quan hi ha metastasi en teixits no limfàtics, les cèl·lules HRS es troben acompanyades del seu microambient

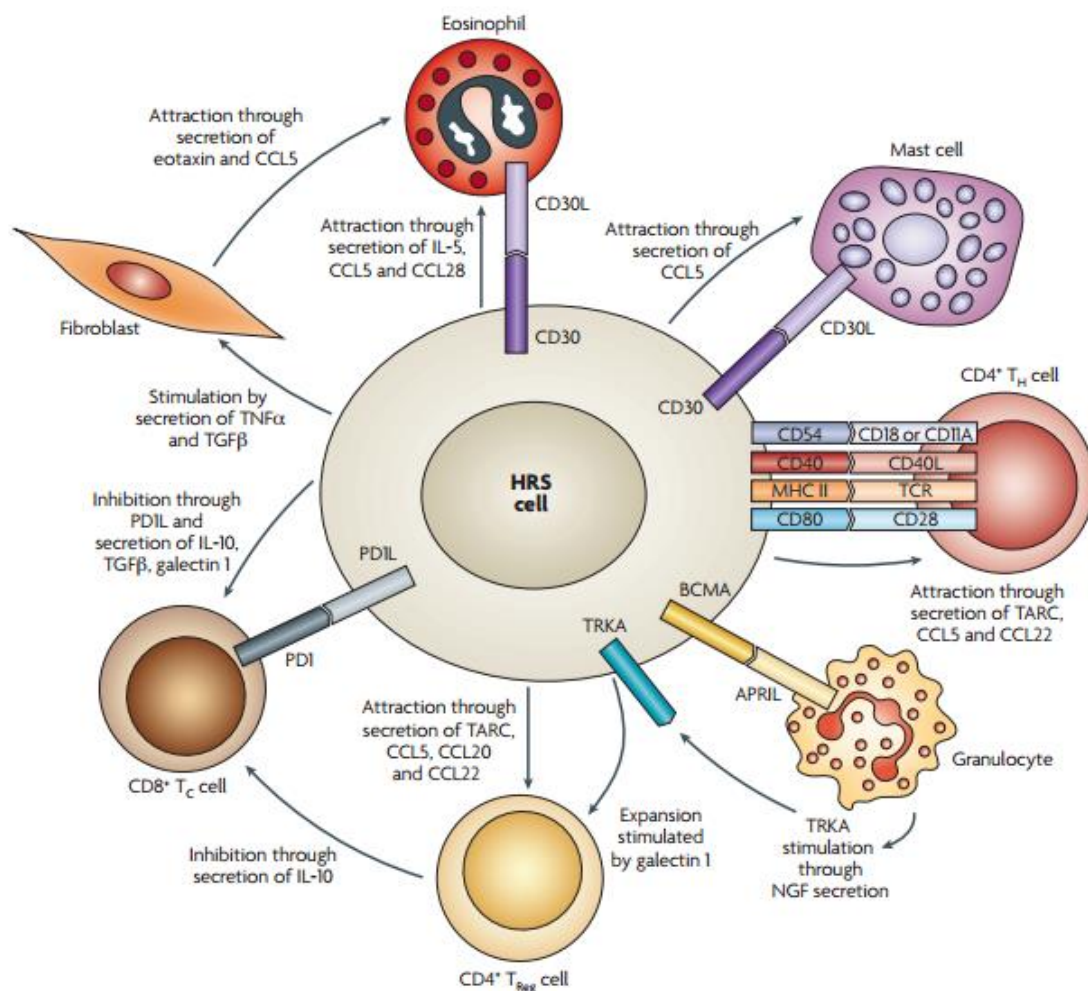


Figura 11. Esquema del diàleg de la cèl·lula HRS amb el microambient tumoral
(Küppers, Nature Reviews Cancer, 2008)

La formació del microambient comença amb les cèl·lules HRS, però després es reforça pel gran nombre de cèl·lules inflamatòries i estromals normals “educades” per les cèl·lules tumorals. A la taula 2, es pot veure la relació de les principals citocines i quimiocines directament involucrades en la formació del microambient secretades per les cèl·lules HRS³³.

La major part del microambient està format per cèl·lules T CD4⁺³⁴, la majoria de les quals expressa un fenotip de cèl·lula T helper 2 (TH2) o T reguladora (Treg). Aquestes poden interactuar amb les cèl·lules tumorals mitjançant CD40, CD80 i CD54, que sembla protegir-les dels efectes dels limfòcits T citotòxics o dels limfòcits *natural killer* (NK). L’enriquiment del microambient amb cèl·lules TH2 i Treg explicaria part de l’evasió a la resposta immunitària³³.

Taula 2. Relació de les principals citocines i quimiocines secretades per les cèl·lules HRS i els seus efectes

Citocina	Efecte
CCL5/RANTES	
CCL17	Atracció de TH2 i cèl·lules Treg
CCL20	
CCL22	
IL-5	
CCL28	Reclutament d'eosinòfils
GM-CSF	
CCL5/RANTES	Reclutament d'eosinòfils
	Atracció de mastòcits
IL-8	Atracció de neutròfils

Les cèl·lules HRS també produeixen citocines immunosupressores com IL-10, TGF β , galectina-1 i prostaglandina E2, que inhibeixen les funcions efectores dels limfòcits T i expressen el lligand de CD95 que indueix l'apoptosi de les cèl·lules TH1 i CD8+ activades³⁵.

Moltes de les cèl·lules HRS perden l'HLA de classe I i II, fet que es correlaciona amb la infecció latent del VEB. La reducció de la immunogenicitat de les cèl·lules HRS podria disminuir l'activació dels LTCs i de les cèl·lules T CD4+.

Una altra molècula que expressen les cèl·lules HRS és el CD40. Aquesta és un membre de la família del receptor del factor de necrosi tumoral (TNFR) i s'expressa en la majoria de cèl·lules B. Interacciona amb el seu lligand, CD40L que expressen les cèl·lules T i serveix com a mecanisme activador de les cèl·lules T, resultant en un canvi de classe de les immunoglobulines. CD95 o Fas també pertany a la família del TNFR que inicia l'apoptosi quan s'uneix al seu lligand, CD95L o Fas lligand. S'expressa a les cèl·lules B dels CGs i està implicat en la selecció selectiva de les cèl·lules B amb anticossos de baixa afinitat³⁶. L'activació dels membres de la família del TNFR resulta en una activació constitutiva de la via de NF- κ B, procés important per al creixement *in vitro* i *in vivo* de les cèl·lules HRS³⁷.

Últimament s'ha donat molta importància a la proteïna de mort cel·lular programada 1 (PD-1 o CD279), un receptor de superfície cel·lular que pertany a la superfamília de les immunoglobulines expressada majoritàriament per les cèl·lules T. Els lligands de PD-1 s'uneixen al seu receptor a les cèl·lules T i provoquen l'exhaustió de les cèl·lules T inhibint

reversiblement els seus efectes i la capacitat de proliferació³⁸. Les cèl·lules HRS expressen els lligands de PD1 a la seva superfície per evadir la resposta immunitària antitumoral per part dels LTCs³⁹. En LHC s'han detectat alteracions a la regió 9p24.1, que conté els lligands de PD-1, PD-L1 (CD247) i PD-L2 (PDCD1LG2). Aquestes alteracions incrementen l'abundància dels lligands. Aquesta regió cromosòmica conté JAK2, que en situació d'amplificació també pot incrementar la quantitat dels lligands de PD-1. A més, s'ha vist que en pacients VEB+, la infecció pot incrementar la quantitat de lligands⁴⁰.

Una gran part de les cèl·lules HRS estan infectades pel VEB i mostren proteïnes de membrana específiques del virus, com la proteïna latent de membrana 2A (LMP2A). Aquesta proteïna imita el RCB i permet a la cèl·lula HRS d'escapar-se de l'apoptosi per selecció d'antigen dins del CG. El VEB també pot influir en la composició del microambient incrementant la producció de citocines involucrades en l'evasió de la immunitat i en el reclutament de les cèl·lules T, com IL-10, CCL5, CCL20 i CXCL10. L'antigen nuclear 1 del VEB (EBNA1) pot incrementar l'expressió de CCL20 de la cèl·lula HRS i manipular les cèl·lules Treg perquè no ataquin les cèl·lules infectades pel virus i promovent la progressió del tumor^{37,41-43}.

La infiltració de macròfags CD68+ és freqüent en el microambient del LH. Steild i cols. van identificar una firma gènica associada als macròfags associats al tumor (MAT) que tenia una associació significativa amb la fallida del tractament de primera línia amb AVBD o similar. En una cohort independent de pacients, es va veure que l'increment del nombre de macròfags CD68+ correlacionava amb una supervivència lliure de progressió (SLP) més curta i amb un increment de la possibilitat de recaure després d'un transplantament autòleg, resultant amb una supervivència específica de malaltia (SEM) més curta. En l'anàlisi multivariant, aquest factor de mal pronòstic era més significatiu que l'*International Prognostic Score* (IPS) per la SEM. L'absència o la poca presència de macròfags CD68+ en pacients d'estadis localitzats definia un grup de pacients amb una SEM de llarg termini del 100% amb l'ús de les estratègies terapèutiques actuals⁴⁴.

Tot aquest diàleg de citocines i quimiocines entre les diferents cèl·lules, crea un microambient capaç de modificar la resposta immunitària, sostenir la capacitat de supervivència i expansió de les cèl·lules HRS i d'induir la resistència a fàrmacs³³.

1.1.8. Estadiatge clínic

Actualment, l'estadiatge clínic del LH es realitza segons els estadis d'Ann Arbor⁴⁵ amb les modificacions de Cotswolds⁴⁶ (figura 12):

- **Estadi I:** només hi ha un grup de ganglis limfàtics afectats o una sola localització extralimfoide (IE).
- **Estadi II:** hi ha dos o més grups de ganglis afectats o estructures limfoides al mateix cantó del diafragma o si hi ha un sol òrgan amb els seus ganglis limfàtics regionals afectats en un mateix cantó del diafragma.
- **Estadi III:** el càncer està present als dos costats del diafragma. Hi pot haver afectació d'un òrgan extralimfoide (IIIE), la melsa (IIIS) o tots dos (IIISE).
- **Estadi IV:** afectació disseminada d'una o més regions extralimfoides, amb o sense afectació ganglionar. Els llocs més freqüents on es dissemina són el fetge, la medul·la òssia o els pulmons.

Aquests estadis es poden complementar amb les lletres "A" o "B" depenent de si hi ha absència o presència de símptomes B, respectivament; amb la lletra "X", si hi ha presència de massa *bulky* (massa mediastínica de diàmetre superior a 1/3 del diàmetre intern transvers de la radiografia a nivell de D5-D6 o amb un diàmetre major a 10cm); i amb la lletra "E", si hi ha afectació extraganglionar localitzada⁴⁷.

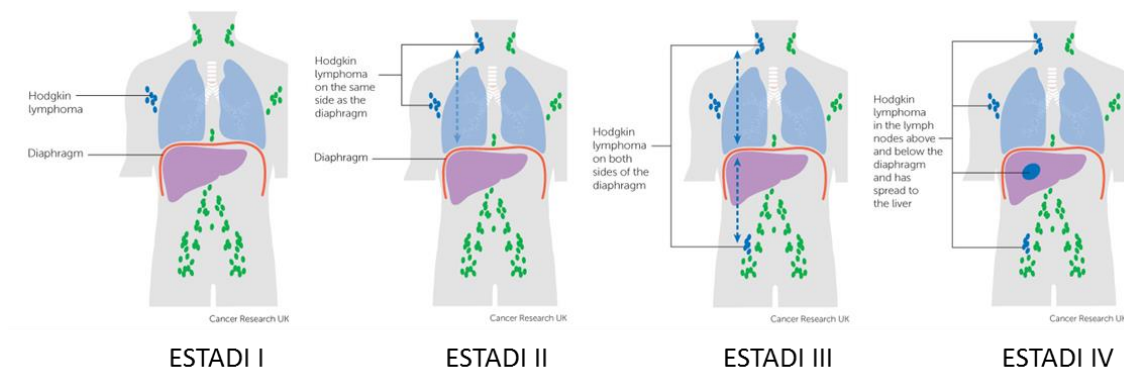


Figura 12. Esquema representatiu dels diferents estadis clínics del LH (www.cancerresearchuk.org)

1.1.9. Factors pronòstics

Per als estadis localitzats (estadis Ann Arbor I-II), el grup cooperatiu de limfoma de la *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC), classifica el pronòstic del pacient segons els següents criteris⁴⁷:

- Pronòstic favorable
 - Edat < 50 anys, ≤ 3 àrees afectades i absència de símptomes B amb velocitat de sedimentació globular (VSG) < 50mm/h
 - Presència de símptomes B amb VSG < 30mm/h i ratio mediastí:tòrax (M:T) < 0.35
- Pronòstic desfavorable
 - Edat ≥ 50 anys
 - ≥ 3 àrees afectades
 - Absència de símptomes B amb VSG ≥ 50 mm/h
 - Presència de símptomes B amb VSG ≥ 30 mm/h
 - Ratio M:T ≥ 0.35

Per als pacients amb estadis avançats (Ann Arbor III-IV), la classificació pronòstica més utilitzada és l'IPS, també conegut com a índex de Hasenclever⁴⁸. Consta de set factors de mal pronòstic:

- Sexe masculí
- Edat > 45 anys
- Estadi IV
- Hemoglobina < 105 g/l (anèmia)
- Leucocitosi > 15×10^9 g/l
- Limfocitopènia < $0,6 \times 10^9$ g/l i/o 8% del recompte leucocitari
- Albúmina < 40 g/l (hipoalbuminèmia)

Aquests factors són coneguts i tenen un sentit biològic. L'edat i el sexe normalment influeixen en el pronòstic del LH, i la possible disseminació està representada en l'estadi IV. Els processos inflamatoris i els seus efectes són provocats per citocines que es reflecteixen en els nivells d'albúmina i hemoglobina, així com en alteracions del recompte limfocitari.

Per cada factor de mal pronòstic que presenta el pacient, es suma un punt al seu "score", que pot anar del zero al set. Un "score" de tres o superior, representa un risc moderadament alt, amb una SLP del 55% i una supervivència global (SG) del 70%. Només el 19% dels pacients tenen un "score" igual o superior a quatre, que s'associa amb el 47% de SLP i una SG del 59% als cinc anys. A la figura següent es poden veure les SLP i SG segons els valors dels diferents "scores" ⁴⁸ (figura 13).

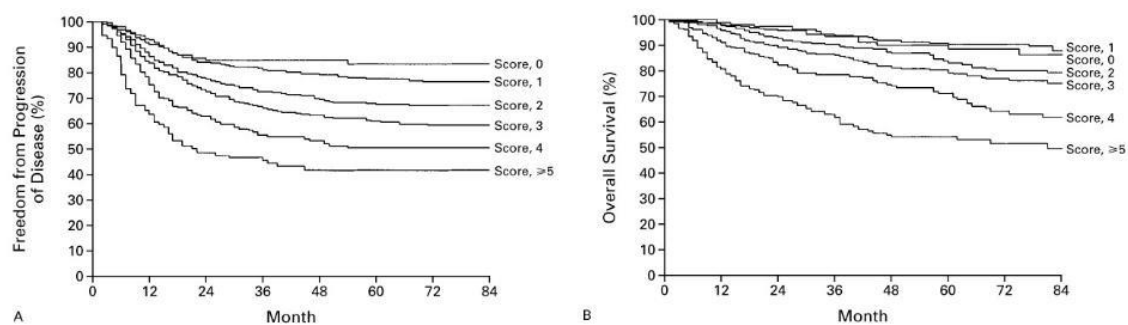


Figura 13. Ús de l'IPS per predir les taxes de supervivència lliure de progressió (A) i de supervivència global (B) en 1618 pacients amb estadis avançats de LH (adaptada de Hasenclever i cols, NEJM, 1998)

1.1.10. Tractaments de primera línia

L'assoliment de la cura d'aquesta malaltia és una de les grans fites de l'oncohematologia del segle XX. La combinació de les noves tècniques, com els rajos X, i la combinació de nous fàrmacs va convertir un diagnòstic fatal en una malaltia curable en un 80% dels casos.

El tractament de primera línia administrat en els últims anys sol estar basat en poliquimioteràpia amb o sense radioteràpia. La intensitat del tractament depèn de l'estadiatge i dels factors de risc. A la taula 3, es mostren algunes de les teràpies de primera línia més freqüents⁴⁷:

Taula 3. Esquemes de teràpia de primera línia més freqüents

Teràpia	Fàrmacs	Efecte
ABVD	Adriamicina/Doxorrubicina	Agent intercalant
	Bleomicina	Inducció del trencaments de ponts entre l'ADN
	Vinblastina	Inhibició de la formació de microtúbuls
	Dacarbazina	Agent citostàtic alquilant
MOPPABV	Mostassa nitrogenada	Agent alquilant
	Oncovin/Vincristina	Inhibició de la formació de microtúbuls
	Procarbazona	Agent alquilant
	Prednisona	Agent immunosupressor
	Adriamicina/Doxorrubicina	Agent intercalant
	Bleomicina	Inducció del trencaments de ponts entre l'ADN
	Vinblastina	Inhibició de la formació de microtúbuls

MOPP	Mostassa nitrogenada	Agent alquilant
	Oncovin/Vincristina	Inhibició de la formació de microtúbuls
	Procarbazina	Agent alquilant
	Prednisona	Agent immunosupressor
BEACOPP escalat	Bleomicina	Inducció del trencaments de ponts entre l'ADN
	VP-16/Etoposide	Inhibidor de la topoisomerasa
	Adriamicina/Doxorrubicina	Agent intercalant
	Ciclofosfamida	Agent alquilant
	Oncovin/Vincristina	Inhibició de la formació de microtúbuls
	Procarbazina	Agent alquilant
	Prednisona	Agent immunosupressor
Standford V	Mecloretamina	Agent alquilant
	Adriamicina/Doxorrubicina	Agent intercalant
	Vinblastina	Inhibició de la formació de microtúbuls
	Oncovin/Vincristina	Inhibició de la formació de microtúbuls
	Bleomicina	Inducció del trencaments de ponts entre l'ADN
	VP-16/Etoposide	Inhibidor de la topoisomerasa
	Prendisona	Agent immunosupressor

Tot i que la majoria dels pacients es curen, les complicacions a llarg termini són una preocupació a l'alça. La taxa de mortalitat del LH presenta una corba amb dues fases linears, una primera fase de caiguda, que representa els pacients que moren a causa de la malaltia, i una segona caiguda anys després del diagnòstic, que representa les morts no degudes al LH però sí als efectes secundaris dels diversos tractaments rebuts. Les principals complicacions a llarg termini són les següents^{47,49}:

- **Segones neoplàsies:** degudes a la sobreirradiació durant la radioteràpia i als tractaments quimioteràpics.
- **Cardiopaties:** degudes a la radioteràpia a la zona mediastínica i a l'ús de la doxorubicina.
- **Alteracions endocrines (problemes de tiroides):** degudes a la radioteràpia a la zona de la base del coll.
- **Infertilitat:** deguda als agents alquilants dels tractaments.
- **Infeccions**

- **Dany pulmonar:** degut a la bleomicina.
- **Anormalitats musculo-esquelètiques**
- **Pèrdua de qualitat de vida**

Per aquest motiu, durant els últims anys, els últims avenços en el tractament del LH s'han centrat en la reducció i/o eliminació de la radioteràpia i en la reducció de cicles de quimioteràpia. El principal objectiu és equilibrar la balança entre l'eficiència i les toxicitats.

La majoria de pacients d'estadis inicials reben una combinació de quimioteràpia seguida d'irradiació localitzada. En un dels seus últims assajos clínics el *German Hodgkin Study Group* (GHSG), ha demostrat que, només dos cicles d'ABVD seguits d'una irradiació localitzada de 20 Gy, són suficients i fa que més del 90% dels pacients es curi. El tractament actual per els estadis inicials desfavorables és o quatre cicles d'ABVD i irradiació localitzada de 30 Gy o dos cicles de BEACOPP seguida de dos cicles d'ABVD i irradiació localitzada. L'EORTC ha demostrat que els pacients amb una tomografia per emissió de positrons (PET) positiva després de dos cicles d'ABVD, si es canviava el tractament a BEACOPP més radioteràpia, els resultats milloraven significativament el pronòstic⁵⁰.

Pel què fa a pacients d'estadis avançats, hi ha proves que el tractament amb BEACOPP és més efectiu que l'ABVD, tot i que presenta més toxicitats a curt i a llarg termini. Els pacients que presenten un PET positiu després de dos cicles amb ABVD, es poden rescatar amb BEACOPP escalat en un 65% dels casos, però els que són PET negatiu poden patir recaigudes en un 15-20% dels casos. Aquestes dades suggereixen que començar la teràpia amb BEACOPP escalat pot reduir la taxa de recaiguda després d'un PET negatiu a menys del 10%. Això pot ser una aproximació efectiva per als pacients de risc molt elevat al diagnòstic, però posa en perill de sobretractar molts pacients si s'aplica de forma no selectiva⁵¹.

Els tractaments de segona línia per LH recurrent i refractari consten de quimioteràpia a dosis molt elevades o transplantaments autòlegs de cèl·lules mare (auto-SCT). Com que el LH és un càncer poc freqüent i altament curable, el desenvolupament de nous fàrmacs va molt lent. Amb els coneixements obtinguts a nivell biològic i molecular de la malaltia, nous fàrmacs estan sota investigació clínica i pre-clínica. L'objectiu del desenvolupament de nous fàrmacs pel LH no és només curar el pacient, sinó anar més enllà i reduir els nivells d'efectes secundaris dels tractaments actuals⁵². A la taula 4, es poden observar diferents fàrmacs de nova generació, alguns d'ells basats en la immunoteràpia.

Taula 4. Fàrmacs de nova generació per al tractament del LH (adaptada de Fadele i cols., J Immunol Res, 2015)

Agent	Mecanisme d'acció
Brentuximab vedotina	Anti-CD30 conjugat a un agent antimitòtic
Bendamustatina	Agent alquilant bifuncional
Panobinostat	Inhibidor de les histona desacetilases (HDAC)
Mocetinostat	Inhibidor HDAC
Everolimus	Inhibidor mTOR
Pacritinib	Inhibidor JAK2
Rituximab	Anti-CD20
Lenalidomida	Agent immunomodulador
Nivolumab	Anti-PD1
Pembrolizumab	Anti-PD1
Ipilimumab	Anti-CTLA4

1.2. ARNs no codificants

El dogma central de la biologia postula que l'ADN es transcriu a ARN, que posteriorment serà traduït a proteïnes. Aquests fets van ser exposats per primera vegada l'any 1956 per Francis Crick⁵³ i reafirmats l'any 1970 en un article a la revista *Nature*⁵⁴. Actualment, sabem que això només es compleix en un 2% dels casos. En més del 90% dels casos restants, aquest ARN té una funció per si mateix. Aquests ARNs reben el nom d'ARNs no codificants i es poden classificar segons la seva llargada: petits, si tenen una llargada inferior a 200 parells de bases (pb); i llargs, si la seva llargada es superior a 200 pb (figura 14).

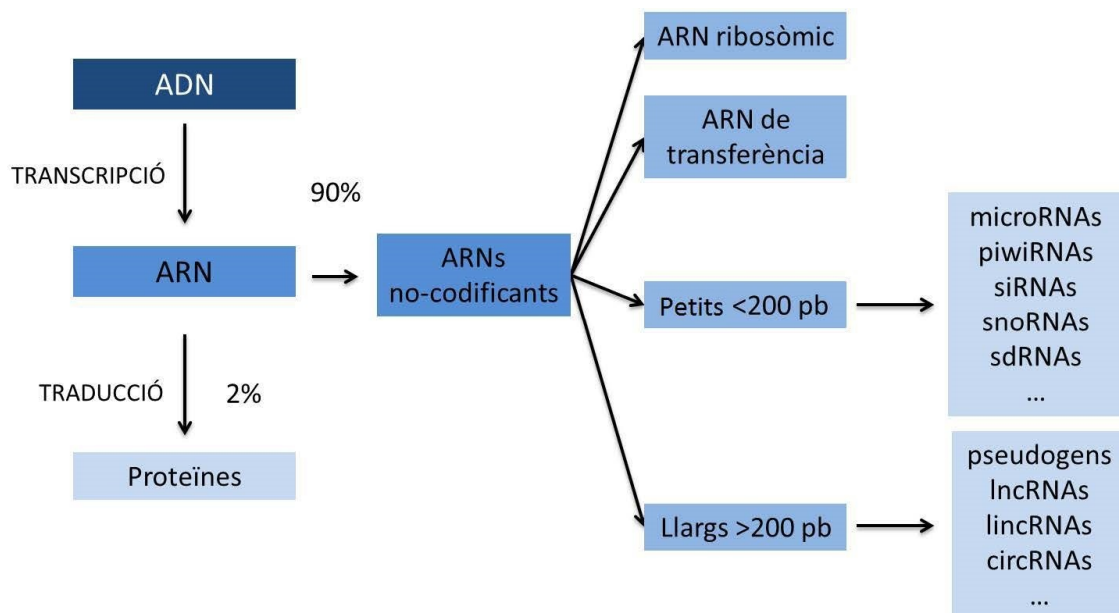


Figura 14. Esquema del dogma central de la biologia incloent els ARNs no codificants

1.2.1. Els ARNs no codificants petits

S'han identificat diverses classes d'ARNs petits no codificants en animals: els microRNAs (miRNAs), els ARNs petits d'interferència (siRNAs), els PIWI-interacting ARNs (piRNAs), els small nucleolar ARNs (snoRNAs), entre d'altres. Cada classe actua per una via diferent però tots s'associen a les proteïnes Argonauta, que els guien cap al seu lloc d'acció per tal de tallar els ARNs diana o dirigir canvis epigenètics en la cromatina⁵⁵. La família Argonauta es pot dividir en tres classes: les proteïnes Argonauta, les PIWI i les WAGO, tot i que aquestes últimes només troben en *C. Elegans*⁵⁶. La subfamília Argonauta s'expressa de forma ubiqua i actua

predominantment amb els miRNAs i els siRNAs. En canvi, les proteïnes PIWI actuen de manera exclusiva amb els piRNAs⁵⁷.

1.2.2. Els microRNAs

Els miRNAs són ARNs petits no codificants amb una llargada entre 18 i 25 pb. Es van descobrir l'any 1993 en el nematode *C. elegans*^{58,59} per Bartel i cols. però posteriorment s'han identificat en varies espècies incloent plantes⁶⁰, virus⁶¹ i humans^{62,63}.

La majoria dels miRNAs humans es troben en introns de gens codificants per proteïna o en regions intergèniques. La resta es troben situats en exons o agrupats amb altres miRNAs formant clústers (per exemple, al cromosoma 19 trobem un clúster anomenat C19MC format per 54 miRNAs)⁶⁴. Segons l'última actualització de miRBase, la base de dades encarregada del registre de noves seqüències de miRNAs, en l'última versió (miRBase 21) mostra que en el genoma humà hi ha 1881 seqüències que codifiquen per miRNAs⁶⁵.

1.2.2.1. Biogènesi dels miRNAs

La biogènesi dels miRNAs comença al nucli. Els gens que codifiquen pels miRNAs són transcrits per la RNA polimerasa 2 com a pri-miRNAs. Aquestes molècules poden tenir més d'una kilobase (kb) de llargada i contenir diversos miRNAs. Abans de passar al citoplasma, són processats per l'activitat RNasa de Drosha i DGCR8, que deixaran uns precursors d'aproximadament 70 pb amb autocomplementarietat anomenats pre-miRNAs. Aquests són exportats al citoplasma per l'exportina-5 (XPO5) i el complex Ran-GTP, on seran escindits per Dicer donant com a resultat un dúplex de 25 pb. Aquest dúplex s'uneix al complex proteic RISC (RNA induced silencing complex), format per PACT, TRBP i Dicer⁶⁶. El complex que selecciona una de les dues cadenes, que esdevindrà la seqüència del miRNA madur. Aquest s'unirà al RISC per guiar-lo fins al ARN missatger (ARNm) diana, on s'unirà per complementarietat obtenint com a resultat la inhibició d'aquest⁶⁷ (figura 15).

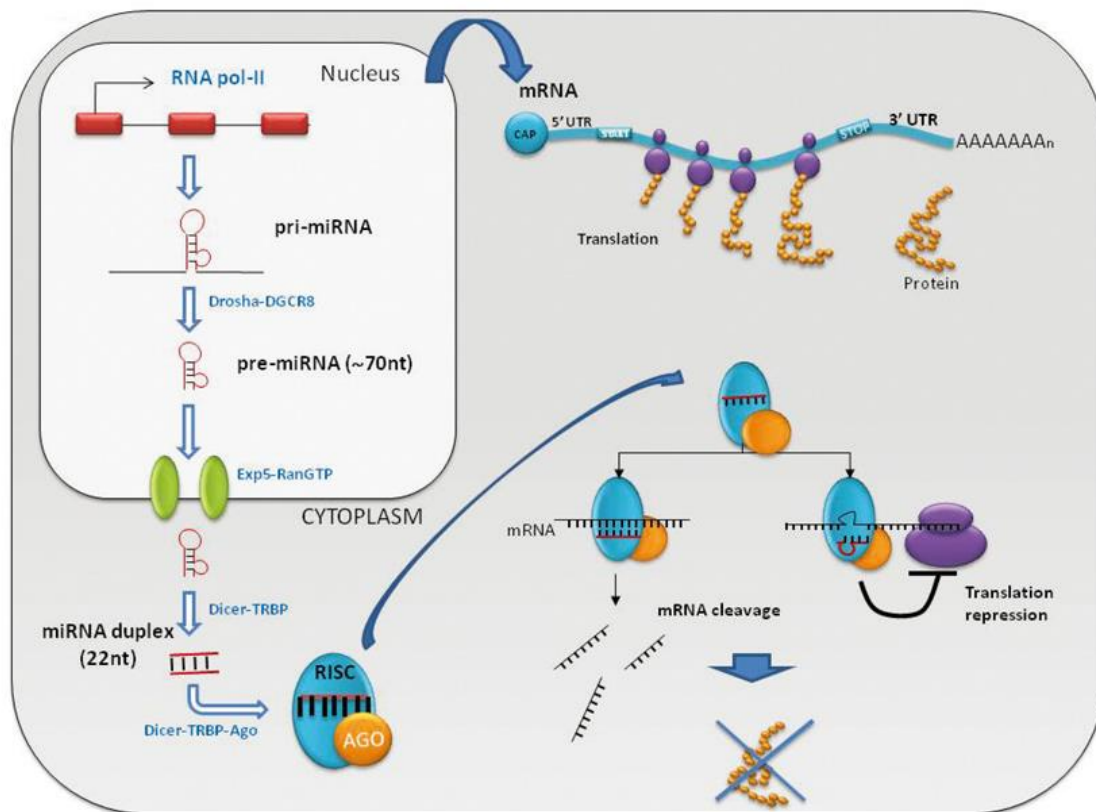


Figura 15. Esquema de la biogènesi dels miRNAs (Navarro A i Monzó M, Yonsei Med J., 2010)

1.2.2.2. Funcions dels miRNAs

La funció més coneguda dels miRNAs és la regulació post-transcripcional unint-se a la regió 3'-UTR dels ARNm. Es considera que un 60% dels ARNm contenen almenys un lloc d'unió per a miRNAs, de forma que poden ser regulats post-transcripcionalment. Un miRNA pot tenir com a diana diversos ARNm, igual que un sol ARNm pot ser la diana de diversos miRNAs diferents⁶². Actualment, es coneixen altres funcions independents del complex RISC o "no-canòniques". A continuació es descriuen algunes de les principals funcions descrites (figura 16):

1. **Degradació de l'ARNm:** En primer pas és la desadenilació de l'ARNm. El miRNA indueix un escurçament de la cua poli-A reclutant CCR4-NOT i els complexos desadenilases PAN2-PAN3 per actuar sobre l'ARNm via la proteïna GW182. Els ARNs desadenilats s'oligouridinen per TUT4/7, que després promou la degradació dels ARNm en animals. A més, GW182 promou la dissociació de la proteïna d'unió a la poli-A (PABP), augmentant l'eficiència de la desadenilació. El segon pas és el *deccapping*. Hi ha activadors de *deccapping* com DDX6, són reclutats al complex CCR4-NOT, que treuen l'estructura del *capping* mitjançant l'enzim CDP2. El tercer pas és la degradació en sentit 5'→3' mitjançant l'activitat exonucleasa de XRN1⁶⁸ (figura 17).

2. **Inhibició de la traducció:** A través del complex CCR4-NOT, GW182 recluta repressors transcripcionals com DDX6 o 4E-T. També poden reprimir la seva transcripció desplaçant l'helicasa d'ARN dependent d'ATP del complex d'unió al *cap* eIF4F, que bloqueja el reclutament de 43S PIC impedit la transcripció. La desadenilació, com també el desplaçament de PABP a través de GW18 i CCR4-NOT, també contribueixen en el total de la inhibició de la traducció⁶⁸ (figura 18).
3. **Activació de la traducció:** Si el miRNA s'uneix a la regió 5'-UTR del ARNm, aquest en lloc de reprimir la seva traducció, l'activa⁶⁹.
4. **"Decoy activity":** També s'ha vist que es poden unir a les proteïnes d'unió a ARN (ribonucleoproteïnes) de forma independent de RISC i impedir que s'uneixin a l'ARN^{70,71}.
5. **Regulació de la transcripció:** Altres estudis indiquen que es poden unir a l'ADN i regular la seva expressió a nivell transcripcional dins del nucli⁷²⁻⁷⁴.

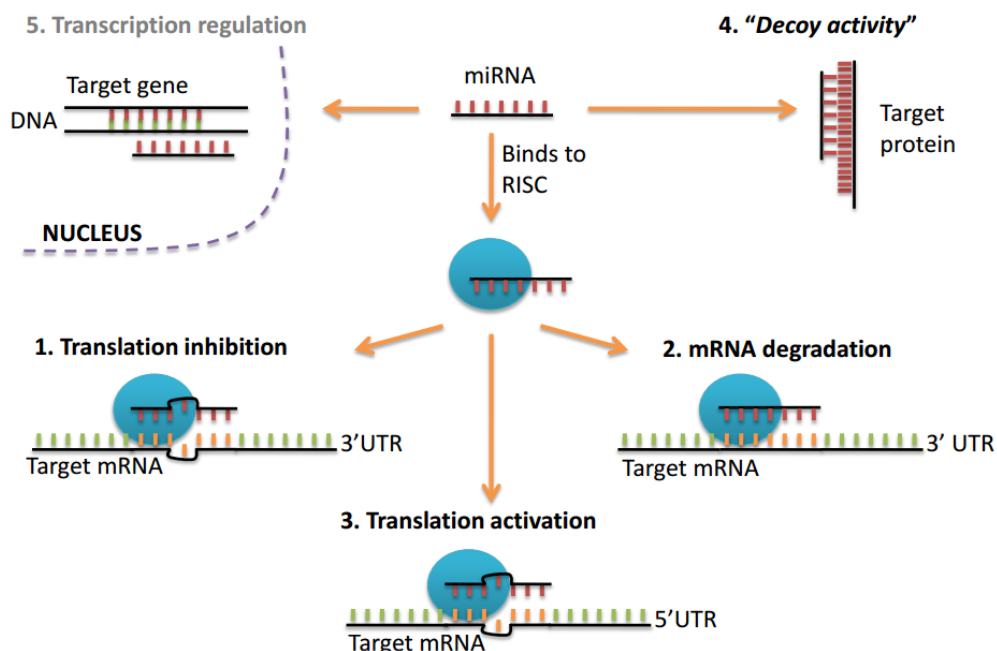


Figura 16. Esquema de les diferents funcions dels miRNAs (T Díaz Sánchez, 2011)

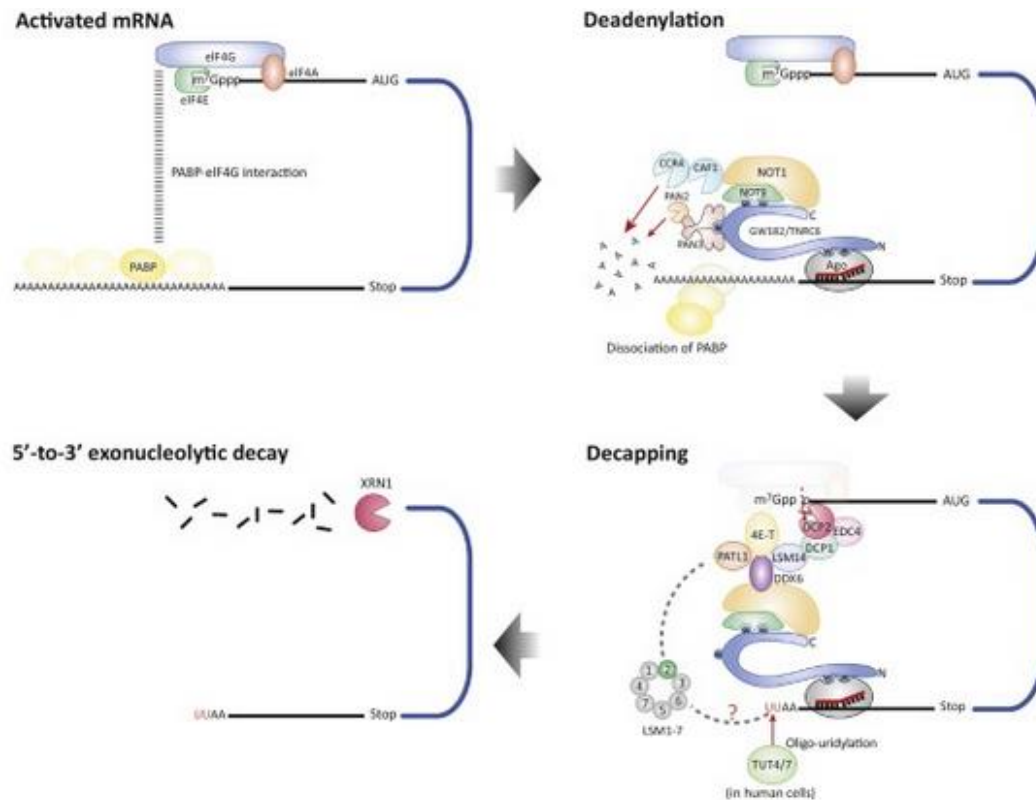


Figura 17. Esquema de la degradació de l'ARNm (Iwakawa H i Tomari Y, Trends in Cell Biology, 2015)

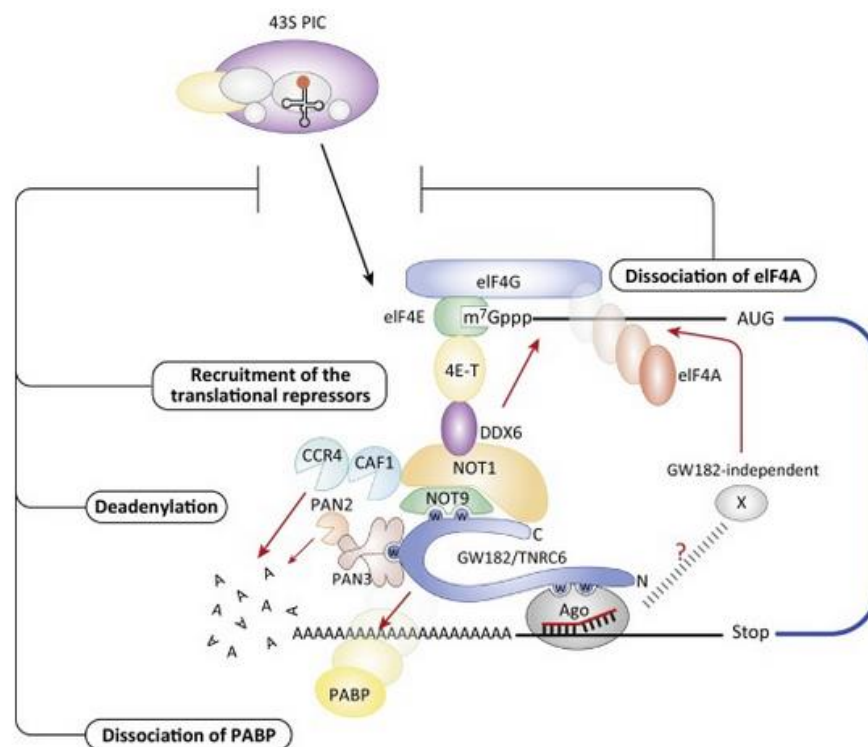


Figura 18. Esquema de la inhibició de la traducció (Iwakawa H i Tomari Y, Trends in Cell Biology, 2015)

1.2.2.3. Mecanismes de regulació de l'expressió dels miRNAs

L'expressió dels miRNAs no és sempre constant, si no que pot ser específica el en temps o en un teixit determinat. Hi ha diversos mecanismes pels quals la seva expressió, igual que la dels gens que codifiquen per proteïnes, es pot veure alterada: els genètics i els epigenètics.

Els **canvis genètics** són aquells que tenen lloc en la pròpia seqüència de l'ADN. Poden afectar només a una base, un fragment o fins i tot a cromosomes sencers^{75,76}:

- Mutacions per substitució
- Polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs)
- Insercions i delecions (indels)
- Variacions en el número de còpies (CNVs)
- Alteracions estructurals i cromosòmiques

Els **mecanismes epigenètics** (del grec, *epi*-, per sobre o més enllà de la genètica) no afecten a la seqüència d'ADN i són reversibles (figura 19).

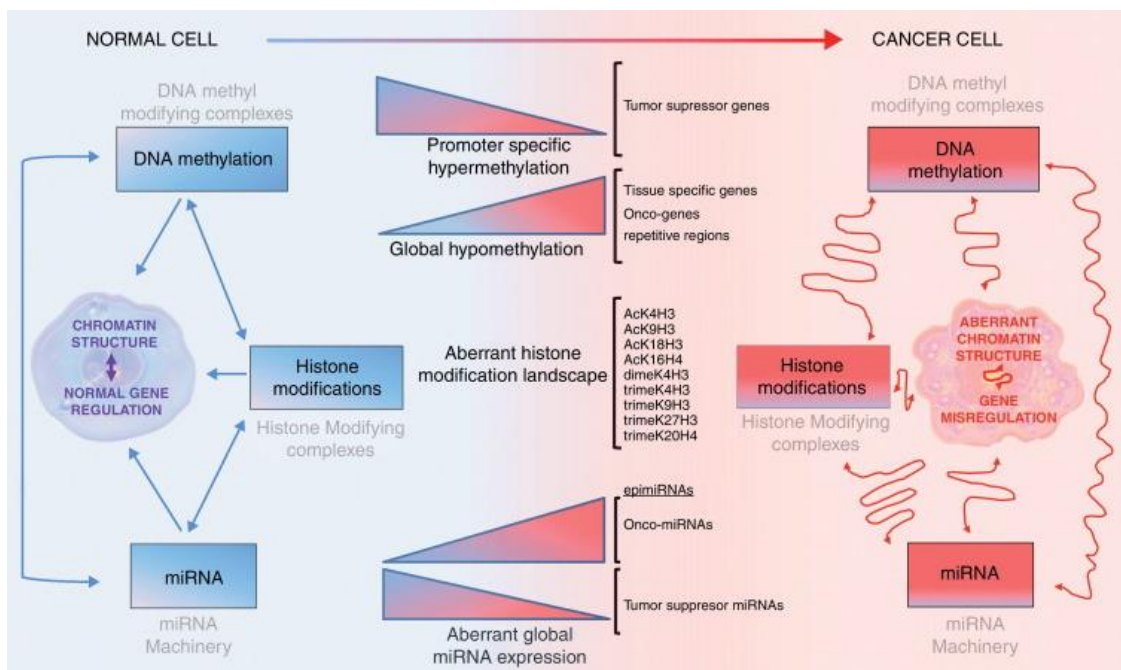


Figura 19. Mecanismes epigenètics en la cèl·lula normal i en la cèl·lula tumoral (Sandoval J i Esteller M, Current Opinion in Genetics & Development, 2012)

- Metilació de l'ADN: Una de les causes més comunes de la desregulació dels miRNAs en càncer és el seu silenciament mitjançant la metilació. La 5-metilcitosina (5mC) és la marca epigenètica predominant en l'ADN eucariota. En mamífers, només s'acostuma a trobar la 5mC en un context de dinucleòtids Citosina-fosfat-Guanina (CpG). Les regions riques en aquests dinucleòtids reben el nom d'illes CpG i es troben en les proximitats dels promotors del 72% dels gens humans⁷⁷. La metilació d'una illa CpG provoca un repressió transcripcional a llarg termini, de manera que aquell gen quedarà silenciats⁷⁸. En el cas dels miRNAs, s'ha vist que aquest mecanisme els pot afectar de diferents formes depenent d'on es localitzi el miRNA:
 - miRNAs intrònics i exònics: la seva transcripció depèn del promotor del gen dins del qual estan situats. Si trobem una illa CpG metilada en el promotor del gen, l'expressió del miRNA estarà silenciada juntament amb el gen que el conté. Un exemple és el miR-342, situat entre els exons 3 i 4 del gen *EVL* (figura 20).



Figura 20. Localització del miR-342 dins del gen *EVL*, que conté una illa CpG al seu promotor. En vermell es destaca el miRNA i la caixa verda representa la illa CpG (<https://genome.ucsc.edu/>)

- miRNAs intergènics: tenen promotor propi. El seu silenciament per metilació pot estar degut a que una illa CpG a la seqüència del miRNA o al seu promotor es trobi metilada. Per exemple, el miR-34a té una illa CpG localitzada en el seu promotor (figura 21) mentre que el miR-203 està situat dins d'una (figura 22).

El **miR-34a** té com a diana gens implicats en la progressió del cycle cel·lular (com l'*E2F3*) i l'apoptosi (*BCL2*), fets que el situen com a miRNA supressor tumoral. En moltes línies cel·lulars tumorals i en pacients, s'ha vist una pèrdua o reducció de la seva expressió. Després de tractar les línies amb un agent desmetilant, es recupera la seva expressió. A més, en la seva regió promotora hi ha un lloc d'unió de p53. Com a mecanisme de reforç per inhibir la seva activitat supressora tumoral, quan la regió d'unió a p53 està metilada, aquesta no s'hi pot unir i no pot induir l'expressió del miRNA⁷⁹.

El **miR-203** està inactivat en diversos tumors humans tant per mecanismes genètics com epigenètics. Aquest es troba localitzat en una regió de 7 Mb al cromosoma 14q32, rica en gens de miRNAs. En els limfòcits normals, aquest gen es troba desmetilat però en molts limfomes de cèl·lula T, aquest gen es troba silenciats ja que un dels dos al·lels es perd i el promotor del gen de l'altre al·lel es troba metilat. En un estudi es va veure que el miR-203 podia tenir com a diana més de 300 ARNm, 22 dels quals es troben sobreexpressats en leucèmia limfàtica aguda. Mitjançant estudis amb Renilla/Luciferasa, es van poder identificar els gens *ABL1* i *BCR-ABL1* (resultant de la proteïna de fusió del cromosoma Filadèlfia) com a diana del miR-203. Aquests gens són coneguts pel seu paper oncogènic en càncers hematològics. També es va veure que el tractament amb agents desmetilants podia induir la reexpressió del miR-203 produint un descens de la capacitat de proliferació de les cèl·lules tractades⁸⁰.

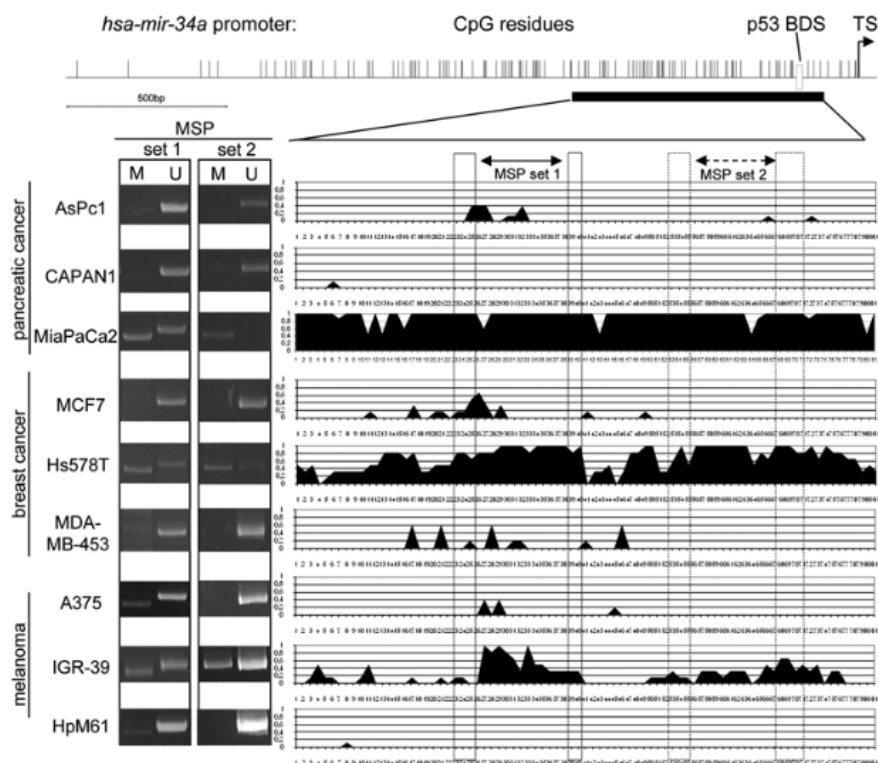


Figura 21. Esquema del promotor del miR-34a on mostren les illes CpG al promotor, que inclou un lloc d'unió per p53. A la dreta, hi ha l'amplificació dels dos jocs de primers per la illa CpG (M, metilat i U, desmetilat). A la dreta, els pics negres representen el grau de metilació de les citosines situades en aquella regió. (Lodygin D i cols., Cell Cycle, 2008)

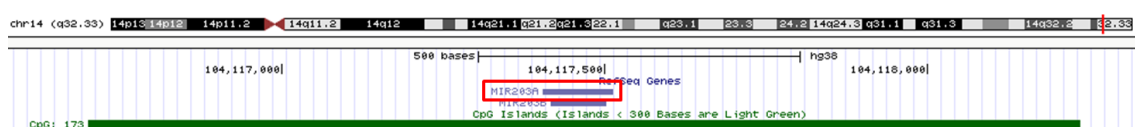


Figura 22. Esquema del miR-203, situat completament dins d'una illa CpG. En vermell es destaca el miRNA i la caixa verda representa la illa CpG (<https://genome.ucsc.edu/>)

- Modificació d'histones: Els octàmers d'histones juntament amb l'ADN formen els nucleosomes, la unitat bàsica de la cromatina. Als nucleosomes, hi ha dues histones de cada tipus: H2A, H2B, H3, i H4. Cada histona té domini C-terminal o cua, on hi tenen lloc diferents modificacions covalents: metilació de l'arginina, acetilació, ubiquitinització i sumoïlació de les lisines, fosforilació de les serines i les treonines, isomerització de les prolines i ribosilació dels ADPs. Aquestes modificacions representen un codi que activa la transició de la cromatina d'eu- a heterocromatina o al revés, tot silenciant-la o activant-la, respectivament^{81,82}.
- ARNs no codificants: Els ARNs no codificants actuen a diferents nivells del genoma regulant altres reguladors epigenètics i modulant l'expressió de les proteïnes, com dirigint complexos proteics cap a promotors concrets. Alguns miRNAs tenen com a diana ADN metiltransferases⁸³, complexos histona desacetilases (HDACs) i gens del grup Polcomb amb funcions repressores de la transcripció⁸⁴. També s'ha vist que alguns miRNAs poden actuar com a moduladors d'altres reguladors de l'expressió gènica gràcies a reconèixer llocs específics a la regió promotora del gen en qüestió, per exemple de determinats factors de transcripció. En alguns casos s'ha vist que el propi miRNA madur té com a diana el seu propi o un altre transcrit precursor, de manera que es genera un sistema de feed-back negatiu⁸⁵.

1.2.2.4. miRNAs i càncer

La primera associació entre miRNAs i càncer es remunta a l'any 2002, quan es buscava el gen responsable de la leucèmia limfocítica crònica (LLC). Es coneixia que una deleció a la regió 13q14 estava present en alguns pacients i, tot i que es van estudiar diversos gens situats en aquesta regió no es va poder identificar el possible gen causant de la malaltia. Al final es va decidir estudiar altres elements presents en aquest fragment del genoma. En aquesta regió s'hi troben dos miRNAs, el miR-15 i el miR-16⁸⁶, coneguts actualment pel seu rol com a supressors tumorals en diverses neoplàsies. Depenent de l'ARNm diana del miRNA, que serà silenciado, aquest pot actuar com⁸⁷:

- **Oncogens o oncomiRs**: són aquells que tenen com a diana gens supressors de tumors, pro-apoptòtics o d'inhibició de la proliferació. Acostumen a estar sobreexpressats en el teixit tumoral.

- **miRNAs supressors tumorals:** són aquells que tenen com a diana gens anti-apoptòtics o de divisió cel·lular. Acostumen a estar infraexpressats en el teixit tumoral.

A més a més, aquests rols no són fixos, si no que trobem miRNAs amb totes dues funcions, exercint-ne una o l'altra depenent del tipus de teixit o de patologia que s'estudiï (figura 23).

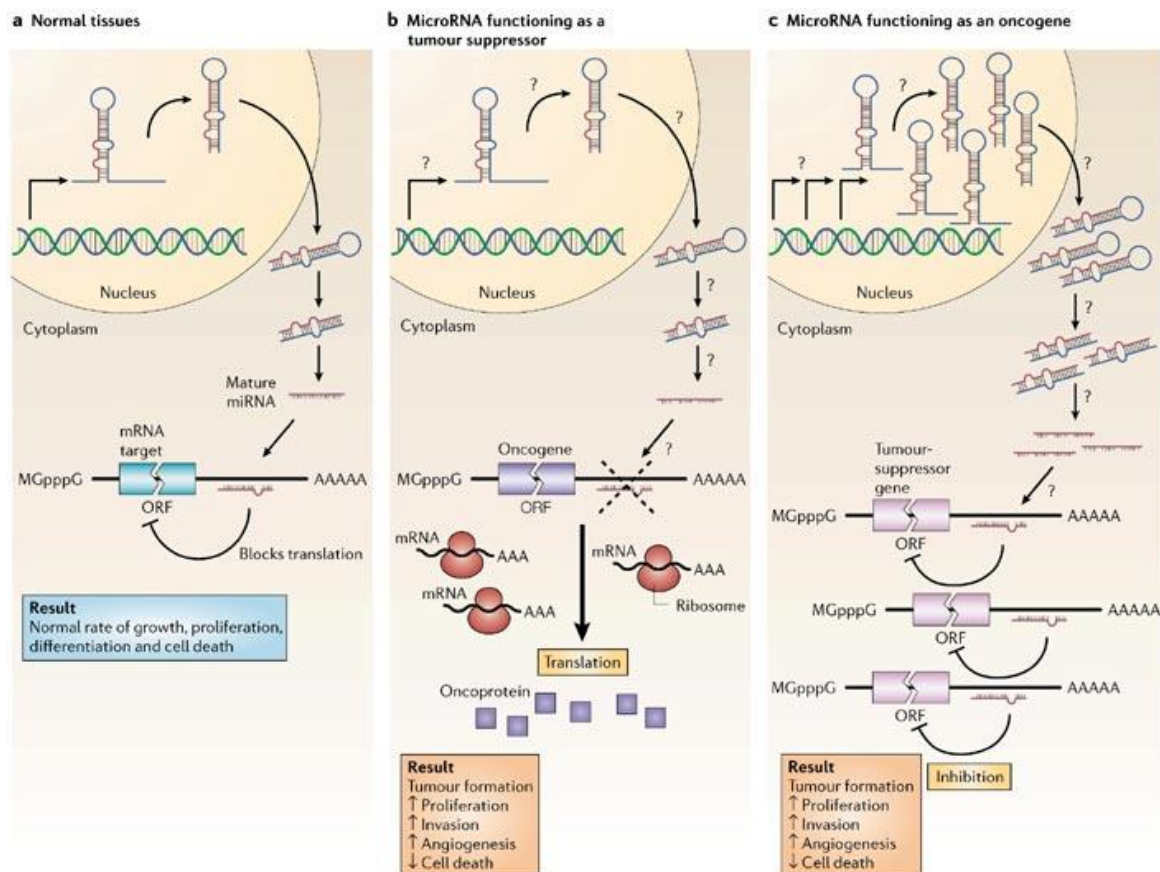


Figura 23. Diferents rols dels microRNAs en teixits normals i tumorals (Esquela-Kerscher *et al.* Nature Reviews Cancer, 2006)

1.2.2.5. miRNAs i LH

La primera evidència que els miRNAs s'expressaven en el LH va ser demostrada per Joost Kluiver i cols. l'any 2005⁸⁸. Prèviament, els mateix grup havia vist que el gen *BIC* (B-cell Integration Cluster) s'expressava de forma elevada en les cèl·lules HRS⁸⁹ i que la seva expressió correlacionava amb l'expressió del miR-155 en línies cel·lulars de LH. Posteriorment, *BIC* va ser identificat com el pri-miRNA del miR-155⁹⁰. Des d'aleshores, diversos estudis han evidenciat la presència i la importància dels miRNAs en la patologia i el pronòstic del LH, tant individualment com en forma de firmes.

1.2.2.5.1. Firmes de miRNAs en LH

En la darrera dècada, només sis grups han definit firmes de miRNAs pel LH. L'evolució de la tecnologia disponible ha permès augmentar el número de miRNAs estudiats per cada mostra, des dels 156 del primer estudi l'any 2008⁹¹ als més de 1000 l'any 2014⁹².

Navarro i cols. van analitzar l'expressió de 156 miRNAs madurs en 49 ganglis limfàtics de pacients de LHc i de deu ganglis reactius (GRs). L'anàlisi no supervisat va mostrar tres clústers ben definits: els pacients de tipus EN, els pacients de tipus CM i els GRs. Una firma de 25 miRNAs podia diferenciar els pacients de LHc i els GRs i va ser validada en una cohort addicional de 30 pacients més i cinc GRs, també en tres línies cel·lulars (L428, L1236 i HD-MY-Z). A més a més, es va determinar per hibridació *in situ* cromogènia, que el miR-21, el miR-134 i el miR-138, que formaven part de la firma de 25 miRNAs, es trobaven sobreexpressats en el citoplasma de les cèl·lules HRS. També es van descriure firmes característiques per als subtipus de EN i CM. Vint dels 25 miRNAs també s'expressaven en les línies cel·lulars, cosa que va permetre als autors especular que els vint eren expressats per les cèl·lules HRS i els cinc restants eren expressats pel microambient (miR-220, miR-302a, miR-302b, miR-302c, i miR-325). La correlació amb les característiques clíniques, va mostrar que el miR-138 es trobava infraexpressat en els pacients amb estadi Ann Arbor III-IV⁹¹.

Van Vlierberghe i cols. van analitzar 360 miRNAs en cèl·lules HRS microdissecades de nou pacients de LHc, de quatre línies cel·lulars (L1236, L540, HDLM2 i KM-H2), i de cèl·lules B de CG CD77+. Això els va permetre identificar una firma de 15 miRNAs, 12 dels quals estaven sobreexpressats i tres, infraexpressats. El miR-155 era el que estava més expressat, juntament amb el miR-21, miR-20a, miR-9 i miR-16⁹³.

Gibcus i cols. va comparar l'expressió de 183 miRNAs en línies del LH (L428, L1236, KM-H2 i DEV) amb altres línies de limfomes de cèl·lula B i va descriure una firma composta per 23 miRNAs específica per les línies de LH. La firma inclou miRNAs clau sobreexpressats (clúster miR-17-92, miR-16, miR-21, miR-24 i miR-155) i infraexpressats (miR-150)⁹⁴.

Mitjançant arrays, Sánchez-Espiridión i cols. van analitzar 723 miRNAs humans i 76 de virals en mostres tumorals de 29 pacients amb LHc avançat i cinc línies cel·lulars (L428, L1236, L540, HDLM2 i HD-MY-Z). Van poder identificar una firma composta per 234 miRNAs, 134 dels quals estaven sobreexpressats en les línies cel·lulars i 100, en les mostres tumorals⁹⁵.

Jones i cols. van estudiar més de 1000 miRNAs en 14 biòpsies de LHc i en vuit de GRs. Només es van incloure en l'estudi pacients amb EN i CM i sense estar infectats pel VIH o l'hepatitis

B/C. L'anàlisi va identificar 474 miRNAs expressats de manera diferència entre les mostres de LHC i les controls, 238 dels quals sobreexpressats. Els investigadors van seleccionar els cinc miRNAs amb l'expressió més elevada (miR-2861, miR-638, miR-494, miR-663b i miR-1973), juntament amb els miR-155, miR-21 i miR-16 d'estudis anteriors^{88,91,93,94}, per aprofundir-hi. L'estudi mitjançant PCR a temps real en les 14 mostres de pacients més 26 d'addicionals va confirmar que els miR-494, miR-1973, miR-2861, miR-638, miR-21 i miR-16 estaven sobreexpressats en els ganglis de LHC, mentre que no es van observar diferències respecte al miR-155⁹².

Per últim, Paydas i cols. van estudiar 377 miRNAs coneguts per la seva associació amb el càncer en 32 mostres parafinades de LHC i 60 GRs per PCR a temps real, i van identificar 11 miRNAs que estaven sobreexpressats i 13 que estaven infraexpressats. Dos d'ells mostraven correlació amb variables clinicopatològiques; el miR-889 estava sobreexpressat en pacients amb símptomes B; el miR-127-3p ho estava en pacients de EN comparats amb els de CM⁹⁶.

Quan es posen en comú les firmes dels diferents grups, es pot veure que hi ha poc solapament entre elles. Aquesta variació pot ser deguda a les diferents plataformes utilitzades, als anàlisis estadístics o al tipus de mostra utilitzat. El miR-21, conegut pel seu rol com a oncomiR en tumors sòlids⁹⁷ i en limfomes de cèl·lula B⁹⁸, es troba sobreexpressat en cinc de les sis firmes, tot i que a la firma de Jones i cols. no arribava a la significança.

1.2.2.5.2. miRNAs relacionats amb el pronòstic i la resposta a tractament en LH

El primer miRNA associat amb la supervivència en LH va ser el miR-135a. En una cohort de 89 pacients de LHC, Navarro i cols. van determinar que el miR-135a es trobava infraexpressat en les mostres de LHC en comparació als GRs i que els pacients amb els nivells més baixos presentaven una supervivència lliure de malaltia més curta (SLM) en comparació als pacients amb nivells alts. El miR-135a tenia com a diana el JAK2, un membre d'una de les principals vies implicades en el LH⁹⁹.

Un altre estudi amb pacients VIH-negatius amb LHC avançat va identificar 34 miRNAs diferencialment expressats entre els pacients amb bon i mal pronòstic. La validació de 12 d'aquests miRNAs en 168 mostres de LHC parafinades va poder crear un "score" compost per quatre miRNAs associat a supervivència lliure de fracàs: miR-21, miR-92b*, miR-30d i miR-30e⁹⁵.

Jones i cols. van analitzar el rol de set miRNAs sobreexpressats en ganglis de LHC en mostres de plasma de pacients en tres punts temporals: abans del tractament, després del PET

provisional entre els cicles 2 i 3 de quimioteràpia i un cop finalitzat el tractament. Cinc miRNAs (miR-494, miR-2861, miR-21, miR-155 i miR-16) estaven significativament elevats en els pacients en el moment abans del tractament en comparació amb els controls sans. A més a més, nivells alts d'aquests miRNAs correlacionaven amb un índex de Hasenclever ≥ 3 . També, els nivells dels miR-494, miR-21 i miR-1973, eren significativament més baixos en el plasma dels pacients que aconseguien una resposta completa (RC)⁹².

Quan es va analitzar el miR-9, miR-20a, miR-21, miR-26a i miR-155 en un altre estudi utilitzant mostres de sang totals de pacients de LH d'abans i després del tractament, es van observar diferències significatives de tots els miRNAs després del tractament amb ABVD, suggerint que aquests miRNAs podrien ser bons biomarcadors per resposta a tractament¹⁰⁰.

1.2.2.5.3. miRNAs implicats en la patogènesi del LH

La majoria dels miRNAs identificats fins avui amb implicacions clíniques o pronòstiques, formen part d'almenys dues de les sis firmes de miRNAs descrites en LH⁹¹⁻⁹⁶. A la taula 5, es resumeixen els miRNAs identificats i les seves dianes:

Taula 5. MiRNAs implicats en la patogènesi del Limfoma de Hodgkin

miRNA	Estat en LHc	Gen diana	Funció
miR-155	↑	AGTR1, ZNF537, FGF7, ZIC3, MAF, IKBKE ⁸⁸ DET1, NIAM, HOMEZ, PSIP1, JARID2 ¹⁰¹	- Limfomagènesi
miR-9 miR-let-7a	↑	BLIMP-1/PRDM1 ¹⁰² DICER1 ¹⁰³ HuR/ELAVL1 ¹⁰³	- Promou la diferenciació de les cèl·lules plasmàtiques - Biogènesi dels miRNAs - Estabilització ARNm
miR-17/106b seed family	↑	YES1, RBJ, NPAT, FBX031, OBFC2A, GPR137B, CCL1, ZNFX1 ¹⁰⁴ CDKN1A (proteïna p21) ¹⁰⁵	- Entrada a la fase G ₁ del cicle cel·lular

miR-21	↑	BCLXL (a inhibició del miR-21 s'associa amb la reducció de les ratios de BCL2/BAX i BCL2L1/BAX)	- Resistència a l'apoptosi i resistència a la doxorubicina ⁹⁵
miR-30			
miR-135a	↓	JAK2 ⁹⁹	- Inhibició de la proliferació i inducció de l'apoptosi

1.2.2.5.4. miRNAs regulats per metilació en LH

Hi ha pocs treballs que hagin estudiat la metilació de miRNAs en LH.

Ben Dhiab i cols. van estudiar la metilació en la zona promotora dels gens del miR-9 (el miR-9-1 (1q22), el miR-9-2 (5q14.3) i el miR-9-3 (15q26.1)) en 58 mostres parafinades de pacients de LH i van observar que el 84,5% d'ells tenien com a mínim un dels tres gens metilats, mentre que cap dels 15 ganglis reactius utilitzats com a controls sans mostrava metilació¹⁰⁶.

El miR-124a és codificat per tres loci diferents (miR-124a-1, miR-124a-2 i miR-124a-3) que contenen illes CpG a la seva regió promotora, que pot se regulada per metilació¹⁰⁷. Ben Dhiab i cols. van estudiar la metilació aberrant dels gens codificants pel miR-124a en una sèrie de 64 mostres parafinades de pacients de LH. Tots els ganglis de pacients presentaven metilació aberrant del miR-124a-1 en comparació als 15 ganglis reactius utilitzats com a controls. La metilació del miR-124a-1 correlacionava amb IPS més elevat; la del miR-124a-2 era més freqüent en homes i nens; i la del miR-124a-3 s'associava a estadis Ann Arbor més avançats. La metilació d'almenys d'un d'aquests gens s'associava a una supervivència lliure d'event (SLE) més curta¹⁰⁸.

1.2.3. Els piwiRNAs

Els piRNAs són ARNs petits no-codificants de cadena simple amb una mida de 26 a 32 pb. Van ser descoberts l'any 2006 simultàniament per cinc grups diferents^{109–113} i reben aquest nom perquè es troben associats a les proteïnes PIWI. Es caracteritzen per estar O-metilats al seu extrem 3'UTR i contenir un fosfat al 5'UTR. De tots els ARNs no codificants són l'espècie més nombrosa, havent-n'hi centenars de milers en un organisme pluricel·lular, especialment en la línia germinal¹¹⁴. Actualment, segons la base de dades que s'encarrega del seu registre, piRNA Bank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/>), hi ha 23.439 piRNAs descrits en humans¹¹⁵ (figura 24).

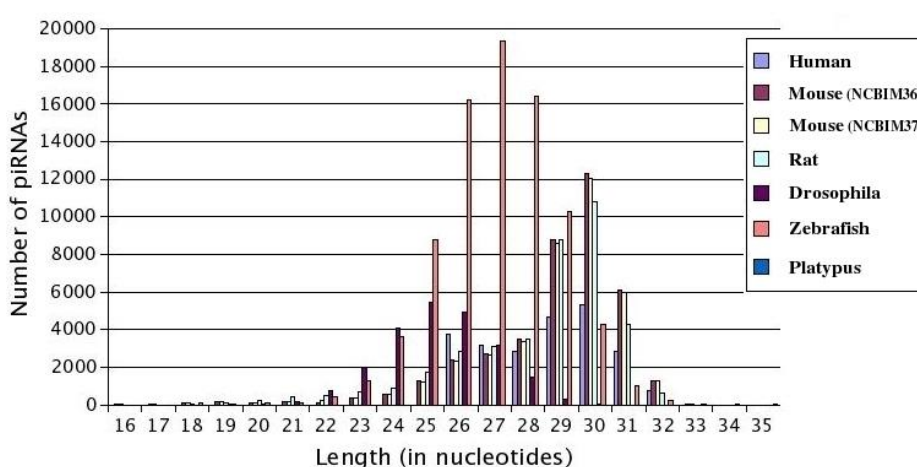


Figura 24. Distribució per llargada dels piRNAs en diferents espècies (Lakshmi i Agrawal, Nucleic Acids Research, 2008)

1.2.3.1. Les proteïnes PIWI

Les proteïnes PIWI (P-element Induced WImpy testis) són una subfamília de les proteïnes Argonauta (Ago), conegudes per participar en la biogènesi dels ARNs no codificants curts. La subfamília PIWI és un llinatge molt conservat al llarg de l'evolució i estan presents tant en plantes com en animals¹¹⁶. Tot i que la majoria d'organismes eucariotes en tenen més d'una (entre tres i quatre), les seves funcions no són redundants. Els humans tenim quatre proteïnes PIWI (PIWIL1-4), tot i que de PIWIL3 se'n desconeix la funció.

Taula 6. Denominació dels membres la família de les proteïnes PIWI en diferents organismes model i en humans

Organisme	PIWIL1	PIWIL2	PIWIL3	PIWIL4
<i>Drosophila melanogaster</i>	PIWI	AUB	-	AGO3
Ratolí (<i>Mus musculus</i>)	MIWI	MILI	-	MIWI2
Humans (<i>Homo sapiens</i>)	HIWI	HILI	PIWIL3	HIWI2

Les proteïnes PIWI es caracteritzen per tenir 3 dominis principals¹¹⁷ (figura 25):

- **PAZ (PIWI, Argonauta i Zwiller):** la funció d'aquest domini és desconeguda però es creu que pot ajudar a la formació de complexos entre les proteïnes Piwi i Argonauta per heterodimerització. Té baixa afinitat per a la unió d'àcids nucleics i interacciona amb els extrems 3' dels ARNs de cadena simple en la regió de tall entre dos subdominis. Es pot unir a l'extrem penjant a 3' dels siRNAs, indicant que més que ser un lloc primari d'unió per a Dicer o RISC (RNA-induced silencing complex), pot contribuir a l'especificitat i productivitat de la incorporació de siRNAs i miRNAs a la via de l'RNAi.
- **MID (middle):** aquest domini s'uneix al fosfat a 5' dels ARNs petits i els ancora a la proteïna PIWI. A més, conté un motiu molt conservat similar al de la unió del capping de la 7-metilguanina (m7G) de l'inici de la traducció en eucariotes pel factor E4 (eIF4E). Algunes proteïnes argonauta poden inhibir la traducció unint-se a m7G prevenint la unió de eIF4E. El domini MID també pot tenir un rol en la interacció proteïna-proteïna.
- **PIWI:** és un domini catalític amb activitat endonucleasa, que conté un plegament RNAase-H-like amb un centre catalític degenerat (Asp-Asp-Asp/Glu/His/Lys) que requereix la unió d'un catió divalent per dur a terme la seva activitat. Talla ARN de cadena simple.



Figura 25. Estructura de les proteïnes PIWI humanes (Bamezai S. *et al*, Stem cells, 2012)

1.2.3.2. Els piRNAs

A diferència d'altres ARNs petits no codificants, com els microRNAs o els siRNAs, la seva biogènesi és independent de Dicer. Els piRNAs es troben al llarg tot el genoma, sols o agrupats en clústers (localitzats a tots els cromosomes excepte en l'Y) i se'n comptabilitzen 114 a l'alineament NCBI37¹¹⁵. Aquests es poden transcriure de forma unidireccional o bidireccional (figura 26). En el cas dels piRNAs que tenen com a diana els transposons, aquests estan situats dins de la seva seqüència, de manera que el transcrit resultant serà complementari al transposó.

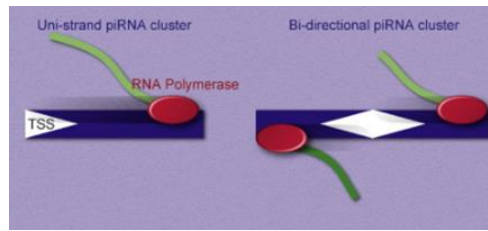


Figura 26. Tipus de transcripció dels clústers de piRNAs
(adaptada de Hirakata S i Siomi MC, Biochimica et Biophysica Acta, 2015)

1.2.3.3. La biogènesi dels piRNAs

La seva biogènesi consta de dues etapes: la via primària, on es generen noves seqüències de piRNAs; i la via secundària o “*ping-pong cycle*”, on s’amplificaran les seqüències existents i tindrà lloc la funció de repressió dels transposons. Els piRNAs poden ser transcrits en forma *sense* (5’→3’) com *antisense* (3’→5’). A diferència d’altres ARNs no codificants petits, la biogènesi dels piRNAs és independent de Dicer i els precursors són de cadena simple.

L’organisme en el qual està millor descrita la via de biogènesi dels piRNAs és en *D. melanogaster*^{114,118} (figura 27):

- En la **via primària**, els precursors són transcrits i exportats al citoplasma. Allà són escindits per una endonucleasa, Zucchini (Zuc), resultant en piRNAs intermedis. Aquests fragments es carreguen a Piwi amb l’ajuda de Shutdown (Shu) i la proteïna de xoc tèrmic 83 (Hsp83). Els fragments amb una U a 5’ són seleccionats preferentment en aquest pas. Després de carregar els fragments a Piwi, un enzim retallador talla a 3’ per ajustar-los a Piwi, després Hen1 metila l’extrem 3’. Aquest procés acaba amb l’obtenció d’un piRNA madur.
- En la **via secundària o cicle del “ping-pong”**, Argonauta 3 (Ago3) s’uneix a la cadena sentit del piRNA madur i catalitza el tall d’un transposó complementari en una base U:A que genera l’extrem 5’ del piRNA anti-sentit. Aquests extrems resultants són carregats a Aubergine (Aub) que amb l’ajuda de Shu i Hsp83 retallen i Hen1 metila l’extrem 3’ per generar el piRNA madur anti-sentit. Aquest guia Aub per tallar un altre transposó i generar l’extrem 5’ del precursor de piRNA sentit que s’associarà amb Ago3, un altre cop amb l’ajuda de Shu i Hsp83. Hen1 metilarà a l’extrem 3’ i el resultat serà un piRNA madur idèntic a l’inicial que ha entrat al cicle, també s’hauran aconseguit inhibir dos transposons.

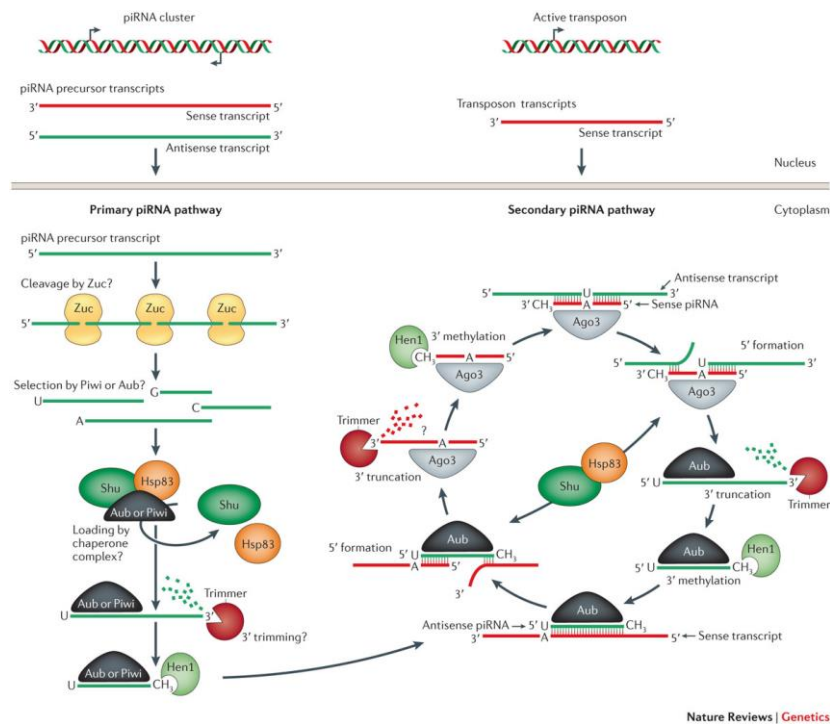


Figura 27. Biogènesi dels piRNAs en drosòfila (Luteijin M i Ketting R, *Nature Reviews Genetics*, 2013)

En humans, s'especula que la biogènesi dels piRNAs podria anar així (figura 28):

- En la via primària els piRNAs seran transcrits al nucli en precursors llargs, de fins a desenes de kilobases, de cadena simple. Aquests seran fragmentats en precursors més petits (piRNAs intermediaris) que seran exportats al citoplasma. Allà, amb l'ajuda de xaperones, seran carregats per PIWIL1 on, mitjançant el seu processament i el de PIWIL2 on es carregarà a continuació, obtindrem el piRNA madur. Aquesta via és la que està més activa durant el desenvolupament embrionari, ja que és la que generarà nous piRNAs.
- En la via secundària o "ping-pong cycle" el piRNA madur carregat a PIWIL2 actuarà com a guia per captar un transposó o seqüència complementària al piRNA madur. Aquesta seqüència serà degradada i la regió complementària al piRNA madur serà carregada a PIWIL4 on es repetirà aquest procés. D'aquesta manera, un cop completat el cicle, obtindrem una còpia del piRNA madur inicial i hauré degradat dos transposons. Per tant, la funció d'aquesta via és la de mantenir el *pool* de piRNAs madurs de la cèl·lula i el silenciament de transposons.

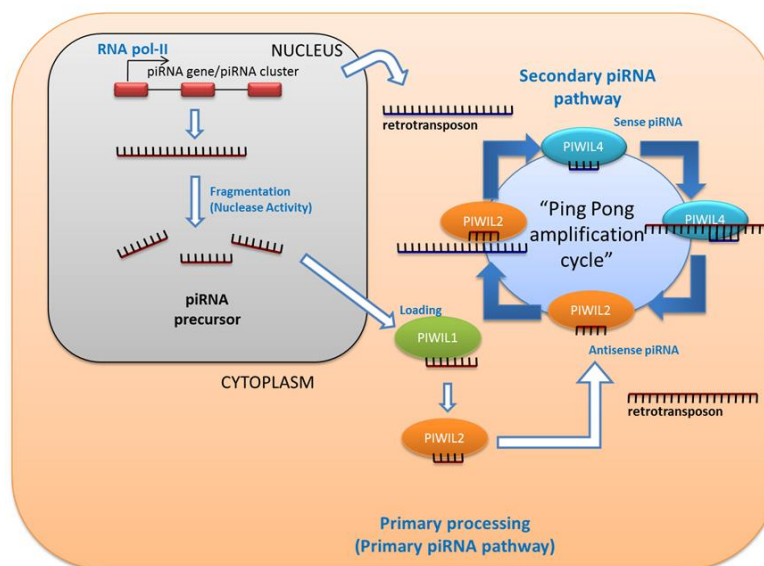


Figura 28. Esquema de la biogènesi dels piRNAs (Cordeiro A. *et al*, Oncotarget, 2016)

En els mamífers, les proteïnes PIWI tenen dos patrons d'expressió diferents durant el desenvolupament en els testicles. Mentre que PIWIL4 només s'expressa en les cèl·lules germinals fetals i perinatals, l'expressió de PIWIL1 està restringida als espermatòcits del paquità i en les espermatides rodones en els testicles adults. PIWIL2 s'expressa des de l'estadi de cèl·lules mare fetals fins a les espermatides rodones en l'adult. Els piRNAs es poden dividir en dues categories segons el seu moment d'expressió durant la meiosi: els piRNAs del pre-paquità i els del paquità¹¹⁹. El paquità és la tercera etapa de la meiosi I i es caracteritza per la hipometilació del genoma que causa que hi hagi molts transposons actius, que poden causar inestabilitat genòmica per insercions. A la taula 7, es resumeixen les seves principals característiques¹²⁰:

Taula 7. Tipus de piRNAs i les seves característiques (adaptada de Meikar et al, Reproduction, 2011)

	Pre-paquità	Paquità
Mida	26-28 pb	28-33 pb
Diana	Elements repetitius	Elements repetitius i altres seqüències del genoma
Proteïnes PIWI implicades	PIWIL2 i PIWIL4	PIWIL1 i PIWIL2
Biogènesi	Via secundària o "ping-pong"	Via primària
Funcions	Silenciament de transposons	Generació de nous piRNAs i altres (inhibir ARNm)
Període d'expressió	En totes les cèl·lules de l'organisme	Cèl·lules germinals i durant el desenvolupament embrionari

1.2.3.4. Funcions de la via PIWI/piRNAs

Actualment es coneix que els piRNAs prenen part en diversos processos cel·lulars: la regulació epigenètica, el silenciament de transposons, el desenvolupament embrionari, el control de la traducció i dels nivells d'ARNm, entre d'altres^{121,122}. A continuació veurem en detall algunes de les seves funcions:

Línia germinal. Les cèl·lules germinals de la majoria d'animals depenen dels piRNAs i de les proteïnes PIWI. Curiosament, els piRNAs en els oòcits de ratolí són relativament rars i dispensables. Els oòcits fetals d'humans expressen PIWIL2 i piRNAs, molts d'ells complementaris a transposons. Els oòcits en l'adult humà expressen PIWIL1 i PIWIL2, mentre que en les vaques (*Bos taurus*) només expressen PIWIL1. En ovaris d'humans, macacs i vaques s'han trobat piRNAs que recorden als dels testicles de ratolí del paquí. En oòcits fol·liculars aïllats de boví s'han trobat abundants piRNAs curts que tenen transposons com a diana preferencial. En oòcits humans en procés de maduració s'ha vist una expressió específica i elevada de PIWIL3, a més de la resta de components de la via PIWI/piRNA. Un *pool* de piRNAs està encara present als embrions primerencs de boví, revelant un impacte potencial dels piRNAs en l'embriogènesi dels mamífers¹²³.

Regulació epigenètica. Estudis recents mostren que la via PIWI/piRNA està implicada en la regulació epigenètica a través de la modificació d'histones i la metilació de l'ADN. En *D. melanogaster* s'ha vist que PIWIL1 interacciona físicament amb la proteïna de la heterocromatina 1a (HP1a) i colocalitzen en molts llocs dels cromosomes. En les mosques on no es produeix aquesta interacció, provoca una pèrdua d'heterocromatina (cromatina compactada inaccessible a les polimerases, per tant no activa transcripcionalment). A part del rol de silenciament, les proteïnes PIWI també poden actuar com a activadors epigenètics. En drosòfiles mutants per PIWIL1, el locus 3R-TAS1 esdevé heterocromàtic, fet que indica el rol de PIWIL1 com a promotor de l'estat eucromàtic en aquest locus concret. Quan s'inserten seqüències complementàries a piRNAs a llocs ectòpics del genoma, això provoca el reclutament de PIWIL1, HP1a i Su(var)3-9 com l'enriquiment de H3K9me i la reducció de l'activitat de l'ARN polimerasa II en aquesta localització. En *C. elegans* PIWIL1 pot iniciar el silenciament transgeneracional a la línia germinal regulant les marques H3K9me, la HP1a i les histona-metiltransferases. A més a més de les modificacions a les histones, en ratolí s'ha vist que a les cèl·lules germinals primordials, els individus mutants per PIWIL2 o PIWIL4, tenen menys illes CpGs metilades i més transposons actius. També s'ha vist que poden metilar l'ADN per crear marques d'"imprinting" a la línia germinal masculina dels ratolins. També s'ha vist en

el gènere de mol·luscs *Aplysia* que poden modular la plasticitat sinàptica a través de la metilació de l'ADN¹¹⁴.

Silenciament de transposons. Els transposons o elements transposables són seqüències d'ADN que poden canviar la seva posició al genoma, sovint generant mutacions i alterant la mida del genoma de la cèl·lula. Aquests “gens saltadors” van ser descoberts l'any 1950 per Barbara McClintock¹²⁴ que li van merèixer el premi Nobel l'any 1983. Es poden classificar en dos grans grups (figura 29):

- **Classe I o retrotransposons:** primer es transcriuen d'ADN a ARN, després l'ARN es torna a passar a ADN i per últim la còpia s'inserta a un lloc nou del genoma. N'hi ha de diferents tipus:
 - Transposons amb *long terminal repeats* (LTRs)
 - *Long interspersed nuclear elements* (LINEs, LINE-1s, o L1s)
 - *Short interspersed nuclear elements* (SINEs), que inclouen les seqüències Alu
- **Classe II o transposons d'ADN:** es transcriuen d'ADN a ADN i el transposó s'inserta a un lloc nou del genoma. Són molt menys nombrosos que els de classe I.

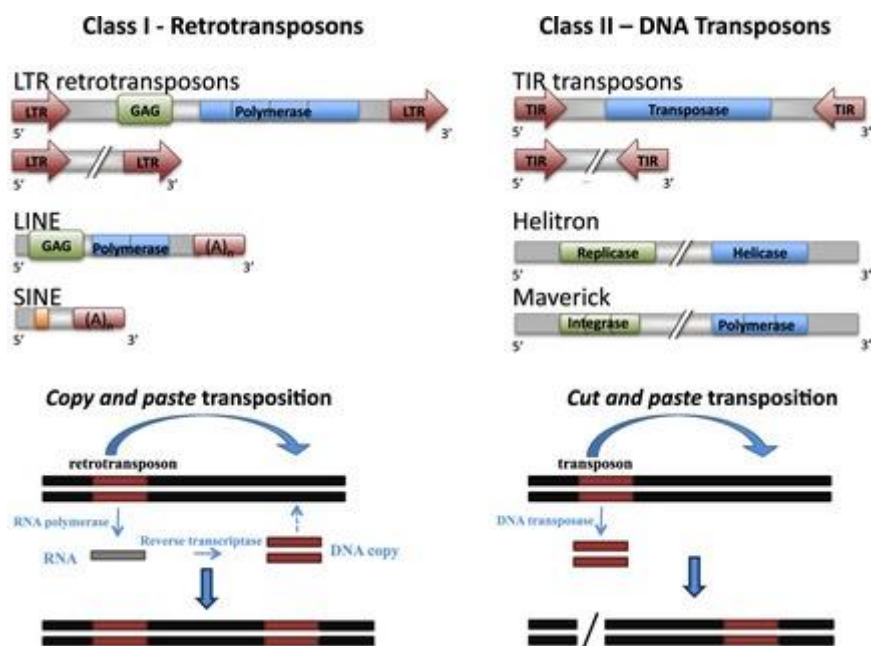


Figura 29. Esquema dels diferents tipus de transposons i del seus mecanismes d'inserció (Bonchev G i Parisod C, Mol Ecol Resour, 2013)

També es poden classificar en autònoms i no autònoms depenent de si en la seva seqüència contenen els enzims necessaris per poder-se copiar o moure's. Aproximadament un 45% del

nostre genoma codifica per aquests element i les seves restes. Les més freqüents són les seqüències *Alu* i *LINE1*¹²⁵. Aquests elements representen una amenaça per a la integritat del genoma ja que depenent d'on s'insertin, poden causar delecions, insercions i translocacions. Com hem vist en l'apartat anterior, durant la via secundària o "*ping-pong cycle*", a partir d'un *pool* de piRNAs madurs, els que tinguin la seqüència complementària al transposó actiu entraran al cicle per degradar-lo i crear més còpies del piRNA madur. Aquesta funció es conserva a través de diferents espècies.

Control de la traducció i dels nivells d'ARNm. L'activitat *slicer* de PIWIL2 i PIWIL4 no només participa durant el cicle del "*ping-pong*" sinó que també silencia transposons a nivell post-transcripcional. S'ha vist que la regió 3'UTR de molts gens codificants és seleccionada per la generació de piRNAs als ovaris de *D. melanogaster*, als testicles de ratolí i als ous de *Xenopus*. Aquests fets suggereixen que els piRNAs poden actuar com a reguladors del recanvi d'ARNm. Per exemple, els nivells de la proteïna Traffic Jam, la 3'UTR de la qual genera molts piRNAs, està sobreexpressada en drosòfiles que tenen PIWIL1 mutat. A més, PIWIL2 està al mateix complex que la deadenilasa CCR4 d'ARNm, l'ARNm de *nanos* i els piRNAs que tenen com a diana l'ARNm de *nanos* a l'embrió de drosòfila. En els embrions mutants per PIWIL2 i PIWIL4 s'ha vist que la proteïna NANOS s'acumula ectòpicament. Aquest rol també s'ha vist en altres organismes. En ratolins, PIWIL1 i els piRNAs estan associats als ARNm. També s'ha vist que PIWIL1 s'uneix eIF4E, una proteïna que participa en el *capping* i en el procés de traducció. PIWIL2 s'uneix a eIF3a, que interacciona amb eIF4E i eIF4G i el complex de *capping*. S'ha observat també en ratolins que PIWIL2 s'associa i estabilitza els ARNm de gens requerits en els estadis post-meiotics de l'espermatogènesi. En *C. elegans*, els ARNm de l'espermatogènesi estan infraexpressats en els mutants per Prg-1 (un ortòleg de PIWI). Totes aquestes observacions en conjunt, revelen un rol conservat al llarg de l'evolució per a les proteïnes PIWI i els piRNAs en el control post-transcripcional i traduccional¹¹⁴.

1.2.3.5. Proteïnes PIWI i càncer

Tot i que fa un temps es creia que l'expressió dels membres d'aquesta via era exclusiva de les cèl·lules germinals, cada cop s'ha anat veient que la seva expressió no es limita només en les cèl·lules germinals sinó que s'amplia a les cèl·lules somàtiques i, fins i tot, en diversos tipus de tumors. Les proteïnes PIWI s'han vist relacionades amb cinc¹²⁶ de les característiques del càncer proposades per Hanahan i Weinberg¹²⁷:

- Promoció de la proliferació cel·lular
- Resistència a la mort cel·lular

- Evasió a la supressió del creixement
- Facilitament de la migració i invasió cel·lular
- Manteniment de l'estabilitat genòmica

En les següents taules es pot veure l'expressió de les diferents proteïnes PIWI en diversos tipus de tumors (taules 8-11).

Taula 8. Expressió en tumors de PIWIL1 (adaptada de Tan et al, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015)

Tipus de tumor	Estat/funció de PIWIL1 (HIWI)
Seminoma	↑ ¹²⁸
Càncer gàstric	<p>El grau d'expressió de PIWIL1 correlaciona amb els diferents estadis de desenvolupament del tumor. Quan s'inhibeix amb un RNAi, inhibeix el creixement cel·lular de línies de càncer gàstric i para el cicle cel·lular a la fase G2/M¹²⁹.</p> <p>↑ Correlació significativa amb l'estadi TNM clínic. S'associa amb una SG més curta. Emergeix com a factor pronòstic independent en l'anàlisi multivariant¹³⁰.</p>
Carcinoma hepatocel·lular	<p>↑ en línies cel·lular metastàtiques, on la seva capacitat de proliferació i invasió disminueix després d'inhibir-lo. ↑ en el tumor. S'associa a un tumor de mides més grans, amb metàstasi intrahepàtica i és un factor de risc independent per SG i per temps a la recaiguda (TR)¹³¹.</p> <p>La seva infraexpressió mitjançant shRNA redueix la proliferació i la migració de línies cel·lulars de carcinoma hepatocel·lular¹³².</p>
Sarcoma	<p>Quan s'inhibeix la seva expressió en sarcomes humans inhibeix el creixement i restableix la diferenciació. La metilació de l'ADN associada a PIWIL1 i el silenciament de CDKI és reversible, juntament amb la tumorigènesi induïda per PIWIL1, a través dels inhibidors de la ADN-metiltransferasa¹³³.</p>
Carcinoma esquamós de cèrvix	<p>Només un 25% dels pacients expressa PIWIL1. Correlaciona mb l'expressió de TBX2 però no amb cap característica clinocopatològica¹³⁴.</p>

Càncer de mama	↑ en tumors i en línies cel·lulars. Promou el creixement cel·lular ¹³⁵ .
Glioma	<p>El silenciament de PIWIL1 promou la inhibició de la proliferació cel·lular promovent l'apoptosi i un augment de la parada del cicle cel·lular. També s'inhibia la capacitat de migració i invasió de les cèl·lules reduint els nivells de metaloproteïnases. La reducció de PIWIL1 també inhibeix el creixement tumoral <i>in vivo</i>¹³⁶.</p> <p>↑ en tumors i la seva expressió correlaciona positivament amb el seu grau. Els pacients amb nivells elevats presentaven supervivències més curtes¹³⁷.</p>
Càncer epitelial d'ovari	↑. En molts casos s'ha vist que el PIWIL1 conté deleccions en l'exó 17 i causa un codó prematur d'STOP. S'expressa específicament en les cèl·lules de l'epiteli cancerós. Quan s'incrementaven els nivells de PIWIL1 en la línia cel·lular SKOV3, curiosament, baixava la capacitat d'invasió ¹³⁸ .
Càncer de pulmó	PIWIL 1 s'expressa en només 11 tumors però en cap dels respectius teixits normals. Els pacients que l'expressen, tenen un TR i una SG més curts. En l'anàlisi multivariant, emergeix com a factor pronòstic independent. Es pot regular, en part, per metilació. Un estudi <i>in silico</i> ha identificat una firma de gens de tipus cèl·lula mare associada a l'expressió de PIWIL1 ¹³⁹ .
Càncer de còlon	<p>↑¹⁴⁰</p> <p>Separant els pacients segons l'estadi N, PIWIL1 és marcador de mal pronòstic per pacients sense metàstasi als ganglis limfàtics¹⁴¹.</p>
Càncer colorrectal	Expressió en alguns teixits tumorals i en alguns dels seus respectius teixits normals. Els pacients amb expressió en ambdós teixits tenien una SG i SLM més curtes. Per als pacients d'estadi I-II, els pacients amb expressió de PIWIL1 tenien una SG i SLM més curtes. Els pacients N0 que expressaven PIWIL1 tenien una SG i SLM més curtes. PIWIL1 emergeix com a factor pronòstic independent en l'anàlisi multivariant per supervivència global ¹⁴² .

Càncer d'esòfag	L'expressió de PIWIL1 en el citoplasma de les cèl·lules tumorals de càncer d'esòfag està associada a grau histològic més elevat, estadi clínic més avançat i a pitjor pronòstic ¹⁴³ .
Càncer de pàncrees	Expressió en la majoria de tumors (40/56). Els pacients que el tenen desregulat tenen un risc més elevat de morir per causes associades al tumor ¹⁴⁴ .
Sarcoma de teixit tou	Nivells alts de PIWIL1 són un factor pronòstic negatiu ¹⁴⁵ .
Càncer d'ovari	↑ ¹⁴⁶

Taula 9. Expressió en tumors de PIWIL2 (adaptada de Tan et al, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015)

Tipus de tumor	Estat/funció de PIWIL2 (HILI)
Càncer de còlon	<p>↑ en el tumor que en la mucosa normal. La seva expressió correlaciona amb paràmetres clínics i patològics més agressius i amb una supervivència lliure de metàstasi als cinc anys més curta. El seu silenciament redueix la proliferació cel·lular, l'habilitat per formar colònies i incrementa l'apoptosi <i>in vitro</i> i inhibeix el creixement tumoral <i>in vivo</i>. El seu <i>knockdown</i> també atenua la migració i la invasió de cèl·lules de càncer de còlon mitjançant la modulació de l'activitat transcripcional de MMP9¹⁴⁷.</p> <p>↑. L'expressió de nivells alts d'EIF2C1 i PIWIL2 s'associava significativament amb l'aparició de càncer de colon¹⁴⁰.</p>
Càncer de mama	<p>Un 90% dels carcinomes invasius i un 81% dels carcinomes in situ tenen expressió molt elevada del PIWIL2. En línies cel·lulars s'ha vist que silenciant PIWIL2, es silenciava l'expressió d'STAT3, de Bcl-XL i de la ciclina D1. Això comporta la reducció de la proliferació cel·lular i de la seva supervivència¹⁴⁸.</p> <p>↑¹⁴⁹</p> <p>Expressió en totes les línies cel·lulars analitzades¹⁵⁰.</p> <p>Detectat en la línia cel·lular MCF-7¹⁵¹.</p>

	<p>PIWIL2 s'expressa en tots els tumors estudiats. El marcatge nuclear exclusiu s'observa poc en estadis precancerosos, mentre que el nuclear, citoplasmàtic o ambdós s'observen en tumors invasius i metastàtics. El patró d'expressió citoplasmàtic correlaciona amb el receptor d'estrògens i el nuclear, amb el de Ki67¹⁵².</p>
Carcinoma colorrectal	<p>L'expressió elevada de PIWIL2 correlaciona significativament amb un grau de diferenciació baix, invasió profunda i invasió perineural. La SG és més curta en pacients amb un alt grau d'expressió de PIWIL2¹⁵³.</p>
Càncer d'ovari	<p>↑¹⁴⁶</p>
Càncer de cèrvix	<p>PIWIL2 es pot detectar per immunohistoquímica en diferents estadis de càncer de cèrvix, tant en adenocarcinomes com en carcinomes esquamosos. També es pot detectar en cèl·lules epitelials metaplàstiques com en cèl·lules histològicament "normals" situades al teixit adjacent al tumor¹⁵⁴.</p>
Seminoma testicular	<p>Hi ha una correlació significativa entre l'expressió de PIWIL2 i SOX17 en el teixit tumoral. Els nivells de PIWIL2 són més elevats en tumors testiculars tipus seminoma que en els no-seminoma, que no deriven de cèl·lules germinals¹⁵⁵.</p>
Càncer de pulmó	<p>↓¹³⁹</p>
Càncer gàstric	<p>↑. Els nivells d'expressió al citoplasma s'associen amb l'estadi T. Els pacients amb nivells alts de PIWIL3 tenen pitjor SG i una taxa de supervivència als 5 anys més baixa¹³⁰.</p>
Càncer epitelial d'ovari	<p>PIWIL2 s'expressa de forma específica en les cèl·lules epitelials canceroses. A més, coexpressa amb MAEL en les cèl·lules estromals adjacents al tumor¹³⁸.</p>
Seminomes, càncer de pròstata, de mama, gastrointestinal, d'ovari i d'endometri	<p>Quan PIWIL2 s'expressa de forma constitutiva s'observa un increment de l'expressió de Bcl-XL i d'STAT3. Quan l'expressió de PIWIL2 es silencia mitjançant RNAi, es suprimeix l'expressió de Bcl-XL i d'STAT3 i s'indueix l'apoptosi¹⁵⁶.</p>

Taula 10. Expressió en tumors de PIWIL3 (adaptada de Tan et al, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015)

Tipus de tumor	Estat/funció de PIWIL3
Càncer gàstric	L'expressió de PIWIL3 és més alta en el teixit tumoral que en el normal. Hi ha una correlació positiva significativa entre el nivell d'expressió i l'estadi T, la metàstasi als ganglis limfàtics i l'estadi TNM clínic ¹³⁰ .
Càncer de còlon	↑ ¹⁴⁰
Càncer d'ovari	↑ ¹⁴⁶
Càncer epitelial d'ovari	↓ en tumors malignes i benignes en comparació amb l'ovari normal ¹³⁸ .

Taula 11. Expressió en tumors de PIWIL4 (adaptada de Tan et al, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2015)

Tipus de tumor	Estat/funció de PIWIL4 (HIWI2)
Càncer de còlon	↑ ¹⁴⁰
Càncer de cèrvix	↑ i promou el creixement cel·lular i la proliferació inhibint l'apoptosi a través de la via p14ARF/p53. També promou la invasió en línies cel·lulars de càncer de cèrvix ¹⁵⁷ .
Càncer gàstric	↑. Els nivells d'expressió al citoplasma correlacionaven amb l'estadi T, la metàstasi als ganglis limfàtics i l'estadi TNM clínic ¹³⁰ .
Càncer de pulmó	↓. Els pacients amb nivells baixos de PIWIL4 tenen un TR i una SG més curts ¹³⁹ .
Carcinoma renal	↑ ¹⁵⁸
Càncer de mama	<p>Detectat en la línia cel·lular MCF-7¹⁵¹.</p> <p>Detectat en totes les línies estudiades, però amb una expressió molt elevada a les SKBR3 i molt lleu a les MCF10A¹⁵⁰.</p>
Càncer d'ovari	↑ ¹⁴⁶

1.2.3.6. piRNAs i càncer

Tot i que es creia que la seva expressió era exclusiva de les cèl·lules germinals, també s'ha descrit la seva expressió en tumors d'origen somàtic. Martínez i cols. van identificar un patró d'expressió de piRNAs que podia diferenciar entre les mostres normals i tumorals de 12 tipus de tumors diferents. En general, els piRNAs estaven sobreexpressats en les mostres tumorals, exceptuant el càncer invasiu de mama i el carcinoma renal de cèl·lula clara. Dels 522 piRNAs expressats, 324 estaven significativament sobreexpressats en les mostres tumorals i 135 s'expressaven exclusivament en els tumors. Aquest fet seria consistent en el possible rol dels piRNAs en promoure la proliferació cel·lular. A més, cada tipus de tumor mostrava un patró d'expressió característic¹⁵⁹.

En la taula 12 es mostra un resum dels piRNAs identificats desregulats en diferents tipus de tumors:

Taula 12. piRNAs descrits en diferents tipus de tumors (adaptada de Ng KW. et al, Molecular cancer, 2016)

Tipus de tumor	piRNAs	Estat al tumor	Referències
Mama	piR-4987	↑	Huang i cols. ¹⁶⁰
	piR-20365	↑	
	piR-20485	↑	
	piR-20582	↑	
Mama	piR-34736	↓	Hashim i cols. ¹⁵⁰
Mama	piR-36249	↓	
	piR-35407	↓	
	piR-36318	↓	
	piR-34377	↓	
	piR-36743	↑	
	piR-36026	↑	
	piR-31106	↑	
Mama (CD44+/CD24-)	piR-932	↑	Zhang i cols. ¹⁴⁹
Gàstric	piR-823	↓	Cheng i cols. ¹⁶¹
Gàstric	piR-651	↑	Cheng i cols. ¹⁶²
Gàstric	piR-59056	↑	Martínez i cols. ¹⁶³
	piR-32105	↑	
	piR-58099	↑	

Ronyó	piR-32051	↑	Li i cols. ¹⁶⁴
	piR-39894	↑	
	piR-43607	↑	
Ronyó	piR-57125	↓ en no-metastàtic vs normal; ↓ en metastàtic vs no-metastàtic	Busch i cols. ¹⁶⁵
	piR-38756	↓ en non-metastàtic vs normal;	
	piR-30924	↑ en metastàtic vs no-metastàtic	
Fetge	piR-Hep1	↑	Law i cols. ¹⁶⁶
Pàncrees	piR-017061	↓	Müller i cols. ¹⁶⁷
Mieloma múltiple	piR-823	↑	Yan i cols. ¹⁶⁸
Pulmó	piR-L-163	↓	Mei i cols. ¹⁶⁹
Pulmó de cèl·lula no petita	piR-55490	↓	Peng i cols. ¹⁷⁰

HIPÒTESIS I OBJETIUS

2. Hipòtesis i objectius

2.1. Hipòtesis

El limfoma de Hodgkin és una neoplàsia de cèl·lules B que es caracteritza per tenir un 1% de cèl·lules tumorals, anomenades cèl·lules de Hodgkin i Reed-Sternberg, en un microambient reactiu. El comportament de la malaltia, per tant, es determina per les característiques pròpies de les cèl·lules HRS i, a més, per les de les cèl·lules inflamatòries no tumorals del microambient. Per això, l'estudi de la funció i del paper pronòstic dels ARNs no codificants petits, concretament dels miRNAs i piRNAs, en gangli sencer i no únicament en les cèl·lules tumorals pren un gran significat.

Els miRNAs, descoberts fa més de 20 anys, són coneguts per poder desenvolupar diferents rols dins de la cèl·lula. Prenen part en les processos fisiològics però també intervenen en el desenvolupament de moltes malalties, incloent el càncer. Poden jugar el paper d'oncogens o de gens supressors de tumors depenent del seu ARN missatger diana. A més, els miRNAs alhora estan regulats per mecanismes genètics i epigenètics. Creiem que estudiar els mecanismes de regulació epigenètica dels miRNAs pot contribuir a entendre la funció dels miRNAs dins del limfoma de Hodgkin. La identificació dels miRNAs inhibits durant el procés de limfomagènesi per metilació ens permetrà identificar miRNAs amb funció de supressors tumorals en el LH.

La via PIWI/piRNA es creia que només estava activa en cèl·lules germinals i embrionàries però actualment hi ha evidències que també pot jugar un paper clau en el procés de carcinogènesi, ja que la seva desregulació provoca inestabilitat genòmica entre d'altres funcions. A més, recentment s'ha identificat el valor pronòstic dels nivells d'expressió de les proteïnes PIWI, principals reguladores del procés de biogènesi dels piRNAs. Tot i així, es desconeix si la via PIWI/piRNA està activa en el limfoma de Hodgkin clàssic i si algun dels seus components hi juga algun paper pronòstic. Creiem que aquesta via pot trobar-se desregulada en el LHC i jugar un paper clau en el procés de limfomagènesi.

2.2. Objectius

Basant-nos amb aquestes hipòtesis, ens hem plantejat els següents objectius:

1. Identificar miRNAs regulats per metilació en LHc. Específicament:
 - a. Identificar miRNAs regulats per metilació en dues línies cel·lulars de LHc mitjançant l'estudi del patró de miRNAs abans i després del tractament amb un agent desmetilant, el 5-Aza-dC.
 - b. Validar el patró de metilació dels miRNAs identificats en quatre línies cel·lulars de LHc i comparar-lo amb el de les cèl·lules B normals.
 - c. Estudiar el patró de metilació de miRNAs seleccionats en mostres de ganglis de pacients amb LHc.
 - d. Avaluar *in vitro* la utilitat terapèutica de l'agent desmetilant, el 5-Aza-dC.
2. Determinar si la via PIWI/piRNA està activa en el LHc. Específicament:
 - a. Estudiar a nivell d'ARNm i de proteïna l'expressió de les proteïnes PIWI (PIWIL1, PIWIL2 i PIWIL4), involucrades en el processament dels piRNAs, en quatre línies cel·lulars de LHc i en ganglis de pacients.
 - b. Determinar si els piRNAs s'expressen en les línies cel·lulars i en les mostres de pacients de LHc mitjançant l'estudi de piRNAs seleccionats per la seva participació en processos d'oncogènesi.
 - c. Correlacionar els nivells d'expressió dels piRNAs estudiats amb les principals característiques clíniques i avaluar el possible impacte pronòstic del seu anàlisi en ganglis de pacients.
 - d. Estudiar l'expressió dels piRNAs seleccionats en mostres de sèrum de pacients de LHc al diagnòstic i un cop assolida la resposta completa.

RESULTATS

3. Resultats

3.1. Article primer: “*Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma*”

Resum

Durant el procés de carcinogènesi es produeixen dos events epigenètics claus per al desenvolupament tumoral: una hipometilació global que, entre altres efectes, provoca inestabilitat cromosòmica i una hipermetilació específica dels gens supressors de tumors. Aquests mecanismes, especialment la hipermetilació de gens específics ha demostrat se un mecanisme clau per la transformació i la supervivència de les cèl·lules HRS del LHC. Recentment, s’ha evidenciat la importància dels ARNs no codificants, especialment els miRNAs, en diverses neoplàsies, incloent el LHC, però no s’ha avaluat la importància de la metilació dels gens del miRNAs en aquesta patologia. L’objectiu del present treball ha estat identificar miRNAs regulats per metilació en línies cel·lulars i en mostres de pacients de LHC. A més, s’ha avaluat el potencial terapèutic *in vitro* de l’agent desmetilant Decitabina (5-Aza-2’-deoxicitidina o 5-Aza-dC).

Es van tractar les línies cel·lulars de LHC amb un agent desmetilant. Al cap de 72 hores es va analitzar el seu perfil d’expressió mitjançant TaqMan Array Human MicroRNA Set Cards v2.0, utilitzant com a control positiu el CD19, que prèviament s’ha descrit metilat en LHC. Després es van seleccionar aquells miRNAs reexpressats en ambdues línies L-428 i L-1236 per avaluar la metilació del seu promotor. A continuació es van estudiar per *Methyl-Specific PCR* (MSP) la metilació en quatre línies cel·lulars i en cèl·lules B control. Finalment, es van validar els resultats en ganglis de pacients per MSP *in situ*. Per altra banda, es van realitzar estudis *in vitro* per avaluar els efectes del 5-Aza-dC sobre la proliferació i la reexpressió de miRNAs supressors de tumors.

Es van analitzar 670 miRNAs després del tractament amb 5-Aza-dC. D’aquests només se’n reexpressaven 56 en la L-428 i 37 en la L-1236, dels quals 13 eren comuns en les dues línies cel·lulars. Només sis d’aquests miRNAs contenien illes CpG susceptibles a ser metilades. En les línies cel·lulars, els gens de *MIR34A*, *MIR203*, *MIR490* i *MIR375* estaven metilats i el clúster *MIR512-525* estava metilat/desmetilat (principalment metilat) en la L-428 i L-1236. El *MIR342* estava metilat en la L-1236 però no en la L-428. Dels 13 miRNAs estudiats, només el *MIR203*, *MIR375* i *MIR512-525* estaven metilats en les quatre línies cel·lulars estudiades. En els ganglis de pacients, el *MIR34A* i *MIR203* es troben metilats en el nucli de les cèl·lules HRS i

desmetilats en el microambient. Després de realitzar el tractament amb l'agent desmetilant, hem vist que hi ha reducció de la proliferació dosiddependent de 5-Aza-dC en les línies L-428, L-1236, HD-MY-Z i L-540. La major reducció de la proliferació es va obtenir amb la dosi màxima de 5-Aza-dC: 20% en la L-428, 34% en la L-1236, 28% en la HD-MY-Z i un 24% en la L-540. De forma interessant, el miR-34a i el miR-203 tenien una reexpressió preferencial a dosis baixes o intermèdies de fàrmac.

El LHc presenta un patró característic de metilació de certs miRNAs, incloent els supressors de tumors miR-34a i miR-203, que poden ser reexpressats mitjançant un tractament amb 5-Aza-dC.

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma

Alfons Navarro¹, Tania Díaz¹, Anna Cordeiro¹, Marina Díaz-Beyá², Gerardo Ferrer³, Dolors Fuster¹, Antonio Martinez⁴ & Mariano Monzó¹

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain, ²Hematology Department, Hospital Clinic Barcelona, Barcelona, Spain and ³Laboratory of Translational Hematology and ⁴Hematopathology Section, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Abstract

Epigenetic mechanisms are crucial for the inactivation of key genes related to the survival of Hodgkin lymphoma (HL) cells, and methylation is a frequent epigenetic mechanism of microRNA silencing. We have examined the methylation-induced silencing of tumor suppressor microRNAs in HL cell lines and confirmed our results in patient lymph nodes. In addition, we evaluated the *in vitro* effectiveness of 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-dC) in HL cell lines. Ten microRNAs containing CpG islands in their promoter region were re-expressed in both the L-428 and L-1236 cell lines. Interestingly, miR-34a and miR-203, both known tumor suppressor microRNAs, were found to be methylated in cell lines and in patient samples. 5-Aza-dC treatment resulted in a dose-dependent antiproliferative effect at 72 h in all the HL cell lines. In summary, 5-Aza-dC treatment of HL cell lines inhibits proliferation at high doses and produces re-expression of the tumor suppressor microRNAs at low-intermediate doses.

Keywords: Lymphoma and Hodgkin disease, cell lines and animal models, chemotherapeutic approaches

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small evolutionarily conserved non-coding RNAs related to the main functional features of cell physiology, including cell cycle regulation, metabolism and apoptosis [1,2]. miRNA expression is dysregulated in cancer, where the overall miRNA pattern in tumors is down-regulated while some miRNAs are up-regulated [3]. miRNAs can play a dual role as either tumor suppressor genes or oncogenes. Several mechanisms that can alter gene expression in the tumor can also affect miRNA expression [3–8], including epigenetic alterations [9].

DNA methylation is an epigenetic modification of the genome that is involved in many cellular processes, including embryonic development, transcription, chromatin structure, X

chromosome inactivation, genomic imprinting, chromosome stability and cancer [10]. Methylation occurs when a methyl group is added to a substrate, typically at CpG sites (cytosine-phosphate-guanine sites, where a cytosine is directly followed by a guanine in the DNA sequence), and results in the conversion of the cytosine to 5-methylcytosine. DNA methylation represses transcription both directly, by inhibiting the binding of specific transcription factors, and indirectly, by recruiting methyl-CpG-binding proteins and their associated repressive chromatin remodeling factors [11].

Tumor-specific methylation patterns can be characterized by either hypomethylation or hypermethylation. In tumor cells, repeat-rich heterochromatin becomes hypomethylated, contributing to genomic instability, a hallmark of tumor cells, through increased mitotic recombination events. *De novo* methylation of CpG islands also occurs in cancer cells, and can result in the transcriptional silencing of growth-regulatory genes [12]. These changes in methylation are early events in tumorigenesis [13].

Hodgkin lymphoma (HL) is a B-cell neoplasm characterized by the presence of a relatively small population of malignant tumor cells, known as Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) cells, in a non-neoplastic microenvironment [14]. The main characteristic of HRS cells is the so-called “loss of B-cell identity,” which consists of the simultaneous loss of expression of many B-cell surface markers, B-cell-specific transcription factors and, above all, loss of the B-cell receptor and its signaling components. Hypermethylation plays a fundamental role in this loss of B-cell identity. The key genes *CD19*, *CD20*, *CD79A*, *SYK*, *PU.1*, *BOB.1*, *BCMA* and *LCK* are hypermethylated in HL [15], indicating that the epigenetic loss of B-cell identity is crucial to the neoplastic transformation process leading to HL [15].

Several recent studies have shown that miRNA genes can be regulated by DNA methylation and other epigenetic mechanisms [16,17]. The presence of altered miRNA gene methylation patterns in human cancers also suggests that

Correspondence: Alfons Navarro, PhD, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, School of Medicine, Human Anatomy Unit, C/Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. Tel: + 34-93-4021903. Fax: + 34-93-4031900. E-mail: anavarroponz@ub.edu

Received 15 September 2014; revised 21 November 2014; accepted 2 December 2014

miRNA gene methylation is functionally necessary for tumorigenesis. In the present study, we have examined the presence of DNA methylation-associated silencing of miRNAs in order to shed further light on epigenetic down-regulation of miRNAs in HL. Our primary objective was to identify tumor suppressor miRNAs silenced by promoter methylation in HL cell lines and to confirm these results in lymph node samples from patients with HL. In addition, since demethylating agents can affect miRNA expression, we evaluated the *in vitro* effectiveness of 5-aza-2-deoxycytidine (5-Aza-dC; commercially known as decitabine [DAC]), a DNA methyltransferase inhibitor, in HL cell lines.

Materials and methods

Cell culture and treatment

Four HL cell lines, L-428, L-1236, L-540 and HD-MY-Z (DSMZ, German Resource Centre for Biological Material) were used. The L-428, L-1236 and HD-MY-Z cell lines were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (Invitrogen, Paisley, UK); the L-540 cell line was cultured in RPMI 1640 containing 20% fetal bovine serum (Invitrogen).

For methylation analysis, the HL cell lines L-428 and L-1236 (1×10^6 cells) were plated 24 h prior to treatment. The next day, cells were treated with 1 μ M 5-Aza-dC for 24 h and then washed and resuspended in fresh medium. After 72 h, cells were harvested and gene expression was assessed. The re-expression of *CD19* gene, which is known to be methylated in HL [15], was used as a positive control for treatment response (Supplementary Figure 1 to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.995650>).

To evaluate 5-Aza-dC *in vitro* effectiveness, we treated the four HL cell lines daily with concentrations of 5-Aza-dC that included the maximum concentrations (C_{\max} 0.3–1.6 μ M) attained in human plasma at clinical doses (20 nM, 250 nM, 1 μ M and 5 μ M) or dimethylsulfoxide (DMSO) (vehicle control), and we assayed proliferation with the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) after 72 h of treatment.

RNA extraction, mRNA and miRNA quantification

Total RNA was extracted from cell lines using TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA) as per the manufacturer's protocol. Total cDNA for mRNA quantification was synthesized from total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) as per the manufacturer's protocol. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using TaqMan Gene Expression assays (Life Technologies) for *CD19* (Hs01047410_g1) and *GUSB* (Hs99999908_m1), used as endogenous control.

The miRNA profile was generated with TaqMan Array Human MicroRNA Set Cards v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). This method is based on a multiplexing reverse transcription (RT)-PCR method for the detection of 670 mature human miRNAs. RT reactions of 4.50 μ L contained: 0.80 μ L of $10 \times$ RT buffer (Applied Biosystems), 0.2 μ L dNTPs (100 mM each), 1.5 μ L MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ L), 0.10 μ L RNase Inhibitor (20 U/ μ L), 0.80 μ L

Megaplex RT primers ($10 \times$), 0.90 μ L of $MgCl_2$ (20 U/ μ L) and 500 ng of total RNA. RT reactions were incubated in a PTC-100 thermocycler for 2 min at 16°C and 1 min at 42°C for 40 cycles, 1 s at 50°C and 5 min at 85°C, and then held at 4°C. RT-quantitative (Q)PCR reactions were performed on an ABI 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) and contained 450 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix No Amperase ($10 \times$) (Applied Biosystems), 6 μ L Megaplex RT product and 444 μ L nuclease-free water.

To determine which miRNAs are down-regulated by methylation in HL, we analyzed the miRNA expression pattern at 72 h of 5-Aza-dC treatment. Fold changes were calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Only the miRNAs that were commonly re-expressed with $2^{-\Delta\Delta C_t} > 8$ in both the L-428 and L-1236 cell lines were included in further analyses.

DNA methylation analysis

DNA methylation status in selected miRNA genes was analyzed by methylation-specific PCR (MSP) after sodium bisulfite modification of DNA using an EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Corporation, Irvine, CA). Human male genomic DNA universally methylated for all genes (Millipore, Billerica, MA) was used as a positive control for methylated alleles. MSP primer sequences for each miRNA are described in Supplementary Table 1 to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.995650>. Following amplification, PCR products were subjected to gel electrophoresis through a 2% agarose gel and were visualized by ethidium bromide staining and ultraviolet (UV) transillumination.

Normal B-cell separation

Normal B-cells from four healthy individuals were magnetically isolated from peripheral blood mononuclear cells using a B Cell Isolation Kit (B-CLL) (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) as per the manufacturer's protocol. The pool of the four patients was used to discriminate between tumor-specific and B-cell lineage-specific methylation.

In situ MSP in patient lymph nodes

Lymph node sections from three patients with HL from Hospital Clínic, Barcelona and three HL cell lines (as control) were analyzed. Approval for this study was obtained from the Institutional Review Board of Hospital Clínic, Barcelona. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Ten microliters of solution at 2×10^6 cells per mL were spread on a Bind-Silane-coated slide and air-dried for 1 h, or 5 μ m of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections on Bind-Silane-coated slides were dewaxed and air-dried for 1 h. The slides were submerged in a 0.3% solution of hydroxide peroxide over night (O.N.) at 37°C. After that, samples were submerged for 4 h in 4% paraformaldehyde in $1 \times$ phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4). Samples were washed with $3 \times$ PBS during 10 min and then with $1 \times$ PBS during 10 min (three times). Finally, slides were washed with distilled water during 1 min and air-dried for 1 h. Proteinase K digestion (6 μ g/mL; Sigma Aldrich) was performed during 6–20 min and inactivated at 95°C for 2 min. A 10 s wash was

performed with $1 \times$ PBS and distilled water, and samples were air-dried for 1 h. A Frame-Seal incubation chamber (Bio-Rad) was used to incubate samples with sodium bisulfite solution (NaOH 0.2 M, hydroquinone 10 mM and bisulfite 3 M; Sigma Aldrich) during 2 min at 95°C and then at 50°C for 14 h. Samples were washed with tap water for 2 min and then with 100% ethanol for 1 min. For the MSP we used AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) and 5' biotin labeled primers, as described in Supplementary Table 1 to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.995650>. The following steps were performed in a FlexCycler thermocycler: 95°C for 10 min and 25 cycles of 95°C for 2 min, 55–60°C (depending on primer) for 1 min 30 s and 72°C for 1 min. After PCR, the frame was submerged in Dako buffer. Finally, immunohistochemistry was performed as previously described [18] using ADVANCE System/horseradish peroxidase (HRP) (Dako) and anti-biotin (ab1227; Abcam) antibody. Finally, sections were counterstained with hematoxylin.

Results

Identification of epigenetically regulated miRNAs

Figure 1(A) (magnification in Supplementary Figure 2 to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.995650>) shows the miRNA expression pattern at 72 h of treatment with 5-Aza-dC. miRNAs with an absolute fold change (\log_{10} relative quantity [RQ]) of ≥ 1 following drug treatment were defined as methylation-regulated genes (Table I). The control gene, *CD19*, was

re-expressed after treatment with a fold change of > 2 (data not shown).

In order to identify the recurrent methylated miRNAs in HL, we selected only the miRNAs that were re-expressed in both the L-428 and L-1236 cell lines. After 5-Aza-dC treatment, 56 miRNAs in the L-428 cell line and 37 in the L-1236 cell line (of 670 miRNAs analyzed) showed an absolute fold change of ≥ 1 . Thirteen of these miRNAs were present in both cell lines: miR-22*, miR-34a, miR-99b*, miR-203, miR-215, miR-335*, miR-342-5p, miR-375, miR-490-3p, miR-512-3p, miR-518e, miR-518f, miR-519a and miR-525-3p (Table I). Only these 13 miRNAs were included in the subsequent validation analysis.

miRNA promoter analysis and hypermethylation validation by MSP

The 14 miRNAs were analyzed with UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>; Feb 2009, GRCh37/hg19) in order to determine the presence of CpG islands in less than 1000 bp of the miRNA gene (in intergenic miRNAs) or of the gene containing the miRNA (in intronic miRNAs). Only *MIR34A*, *MIR203*, *MIR342*, *MIR375*, *MIR490* and the *MIR512-525* cluster (also known as C19MC) contained these CpG islands. We then designed primers for the MSP analysis of these CpG regions in the two cell lines and in a pool of normal peripheral B-cells (Supplementary Table 1 to be found online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2014.995650>).

After DNA bisulfite treatment, the MSP analysis showed that *MIR342*, *MIR375* and *MIR490* were unmethylated, and

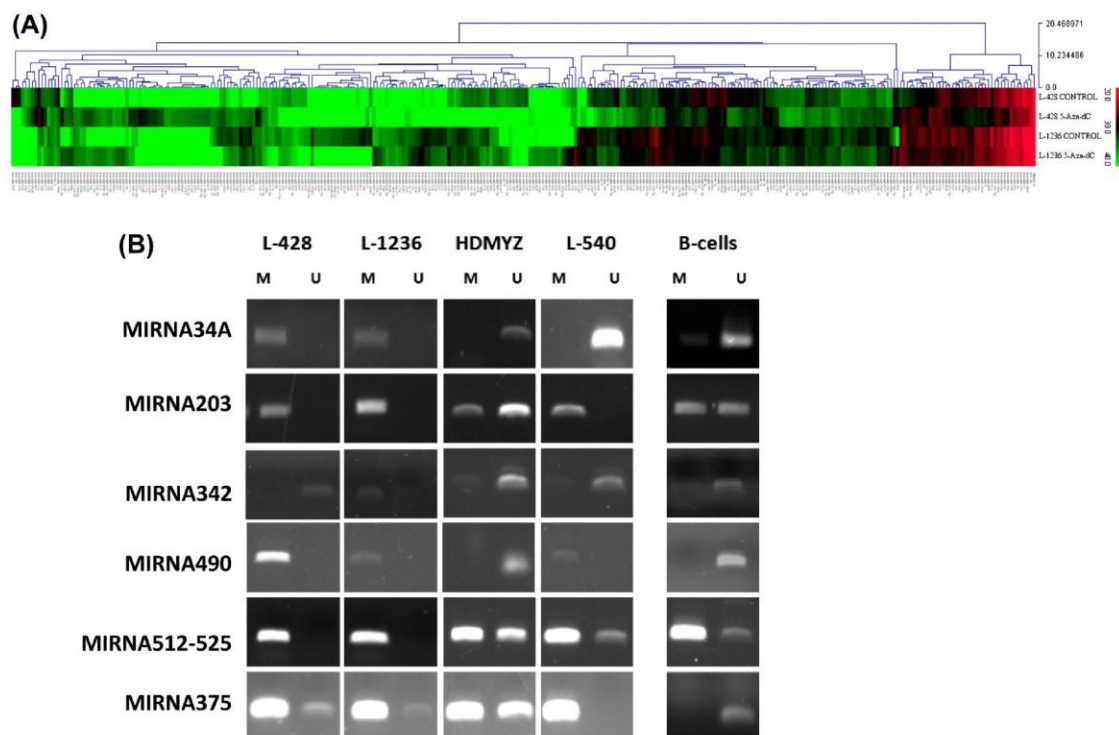


Figure 1. (A) miRNA expression pattern at 72 h of 5-Aza-dC treatment. Data are presented as \log_{10} of relative quantification normalized with regard to RNU48 and relative to non-treated cell lines. (B) Methylation specific PCR (MSP) of selected re-expressed miRNAs. M, methylated pair of primers; U, unmethylated pair of primers.

Table 1. miRNAs re-expressed after 5-Aza-dC treatment. In bold, miRNAs re-expressed in both cell lines.

miRNA	L-428 (2 ^{-ΔΔCt})	L-1236 (2 ^{-ΔΔCt})
hsa-let-71*		19.84125785
hsa-miR-105		15.01150395
hsa-miR-10b*	19.28031559	
hsa-miR-126*	22.64905117	
hsa-miR-130a		17.26284236
hsa-miR-135b*	22.30311073	
hsa-miR-135b		17.66704355
hsa-miR-138-1*	22.92461702	
hsa-miR-138		377.1008532
hsa-miR-146b-5p	20.84699379	
hsa-miR-149*	9.189247281	
hsa-miR-150		652.1851541
hsa-miR-154*	17.19934977	
hsa-miR-15a*	13.0106497	
hsa-miR-17*	29.00385689	
hsa-miR-192*	17.89565662	
hsa-miR-193a-5p		64.16116771
hsa-miR-199a-3p	14.7429014	
hsa-miR-200b	26.63767379	
hsa-miR-203	8.829832469	48.66444427
hsa-miR-215	14.61075338	31.01584406
hsa-miR-22*	10.31657681	39.05814213
hsa-miR-222*	31.95288943	
hsa-miR-25*	275.3680991	
hsa-miR-29b-1*	22.14262661	
hsa-miR-30a*	80.29329178	
hsa-miR-323-3p		27.32723013
hsa-miR-335*	29.40017847	60.74793448
hsa-miR-342-3p		482.0188878
hsa-miR-342-5p	22.04343265	23.73451309
hsa-miR-34a*		54.48229594
hsa-miR-34a	82.26087437	11.86725655
hsa-miR-372	81.07587591	
hsa-miR-375	28.43931188	2.280505249
hsa-miR-378*		80.09868863
hsa-miR-429		14.47384423
hsa-miR-455-5p		21.69261737
hsa-miR-486-3p		34.45766716
hsa-miR-490-3p	11.21437253	23.73451309
hsa-miR-501-5p	37.66511661	
hsa-miR-503		22.28993761
hsa-miR-508-3p	19.04204999	
hsa-miR-509-3p	0.700898283	
hsa-miR-512-3p	480.7279285	98.30536498
hsa-miR-516a-3p	17.75472408	
hsa-miR-517a	276.4461352	
hsa-miR-517c	261.7038219	
hsa-miR-518a-3p	73.15435491	
hsa-miR-518b	26.48715514	
hsa-miR-518e	41.41198853	23.15874484
hsa-miR-518f	77.37578493	10.57682541
hsa-miR-519a	28.15377104	9.788510054
hsa-miR-519b-3p	42.72133988	
hsa-miR-519c-3p	35.49974527	
hsa-miR-519d	139.6730711	
hsa-miR-520c-3p	193.1456174	
hsa-miR-520g	133.3307639	
hsa-miR-520h	337.2820926	
hsa-miR-522	34.52422289	
hsa-miR-524-3p	26.00088184	
hsa-miR-525-3p	15.97781231	12.23993334
hsa-miR-526b*	145.70431	
hsa-miR-551b*	9.933855979	
hsa-miR-564		14.44953052
hsa-miR-576-3p		14.90645289
hsa-miR-598		181.7000825
hsa-miR-604	18.93190161	
hsa-miR-605		20.39841527
hsa-miR-616*		56.52236754
hsa-miR-632	42.56099342	
hsa-miR-638	9.404907431	

(Continued)

Table I. (Continued)

miRNA	L-428 (2 ^{-ΔΔCt})	L-1236 (2 ^{-ΔΔCt})
hsa-miR-643	9.864367678	
hsa-miR-650		691.9347809
hsa-miR-7	13.30220127	
hsa-miR-758		14.38586559
hsa-miR-760	63.2868745	
hsa-miR-923		1253.508565
hsa-miR-944		24.9166072
hsa-miR-99a*	19.24190394	
hsa-miR-99b*	5.871504648	23.16999763

*In bold, miRNAs re-expressed in both cell lines.

miRNA, microRNA; 5-Aza-dC, 5-aza-deoxycytidine.

MIR203, *MIR34A* and *MIR512-525* cluster were methylated/unmethylated (patients that showed amplification in the MSP assay with both pairs of primers) in the pool of normal peripheral B-cells. Based on the amplification observed in each pair of primers, we considered *MIR34A* mainly unmethylated and *MIR512-525* mainly methylated. Analysis in the cell lines showed that *MIR34A*, *MIR203*, *MIR490* and *MIR375* were methylated and the *MIR512-525* cluster was methylated/unmethylated (mainly methylated) in both the L-428 and L-1236 cell lines. *MIR342* was methylated in the L-1236 HL cell line but not in the L-428 cell line. To further validate these findings, we analyzed the methylation pattern in the HD-MY-Z and L-540 HL cell lines and found that only *MIR203*, *MIR375* and *MIR512-525* were methylated in all four HL cell lines analyzed [Figure 1(B)].

In situ MSP of miR-203 and miR-34a

Since miR-34a and miR-203 have been described as tumor suppressor miRNAs in several tumors, we selected these two miRNAs for *in situ* MSP in samples from three patients with HL. Figure 2 shows the results of MSP analysis. The reaction product, which gives the cells a brown color, of miR-203 and miR-34a was predominantly located in the nucleus of HRS cells when using methylated primers. In some cases, due to the nucleus:cytoplasm ratio, the signal seemed to be spread over the cytoplasm. When using unmethylated primers, the staining was predominantly in the microenvironment cells.

Dose-dependent effect of 5-Aza-dC treatment

We observed a 5-Aza-dC dose-dependent reduction in proliferation in the L-428, L-1236, HD-MY-Z and L-540 cell lines (Figure 3). The most significant reduction was observed at the highest 5-Aza-dC dose: 20% in L-428 ($p = 0.02$); 34% in L-1236 ($p < 0.0001$); 28% in HD-MY-Z ($p = 0.007$); and 24% in L-540 ($p = 0.02$) (Figure 3). Interestingly, miR-34a and miR-203, which have previously been reported as tumor suppressor miRNAs [19–22], showed a preferential re-expression at low or intermediate doses of 5-Aza-dC. When the median of all four cell lines was analyzed, the expression of miR-34a peaked at a dose of 0.25–1 μ M, while that of miR-203 peaked at a dose of 0.25 μ M (Figure 3).

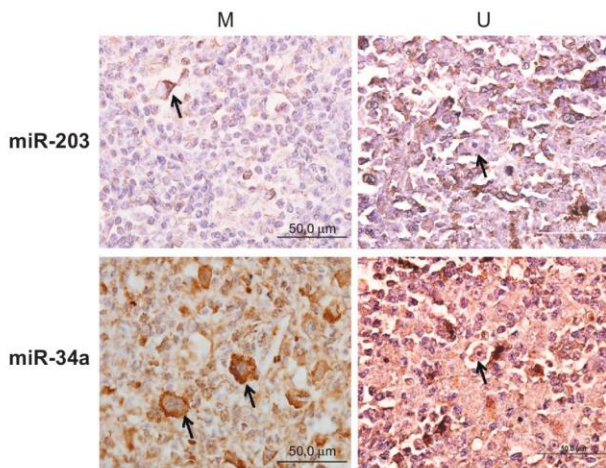


Figure 2. *In situ* MSP. Selected images of *in situ* MSP of miR-203 and miR-34a in lymph node samples from patients with HL. Arrows indicate HRS cells.

Discussion

HL is an atypical neoplasm characterized by the rescue of germinal center B-cells from apoptosis after immunoglobulin rearrangement. Epigenetic mechanisms are crucial for the inactivation of key genes related to the survival of HRS cells [15], and specific miRNA patterns have been identified in HL samples and cell lines [23–26]. In the present study, we have analyzed the influence of methylation on the silencing of tumor suppressor miRNAs in HL cell lines. Due

to the low numbers of tumor cells in primary HL biopsies (<1%), our analyses were restricted to HL cell lines, which are widely used in the study of HL. We observed changes in expression levels of several miRNAs after treatment with the demethylating agent 5-Aza-dC, and we identified a group of 13 miRNAs that were re-expressed in both the L-428 and L-1236 HL cell lines. In the profile phase of the study, we observed a relatively low overlap between the two cell lines used, L-428 and L-1236. This could be explained in part by differences in the patients of origin of the cell lines. L-428 was derived from a patient with the nodular sclerosis subtype of HL, while L-1236 came from a patient with mixed cellularity subtype. We have previously observed major differences in the miRNA expression patterns of patient lymph nodes from nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes, which could be used to discriminate between the two groups of patients in unsupervised and supervised analyses [25]. To validate the 13 miRNAs, we performed MSP analysis and compared the HL cell lines to normal B-cells obtained from peripheral blood. One limitation of the present study is that the perfect normal counterpart for this comparison would have been germinal center B-cells instead of peripheral blood B-cells; however, no germinal center B-cells were available to us. After this analysis, we identified several methylated miRNAs, including miR-34a and miR-203, which have previously been identified as tumor suppressors that are silenced by methylation in multiple malignancies including some lymphomas [19,22,27–31]. miR-375 and miR-342 have been reported to be deregulated by methylation in breast [32] and colorectal

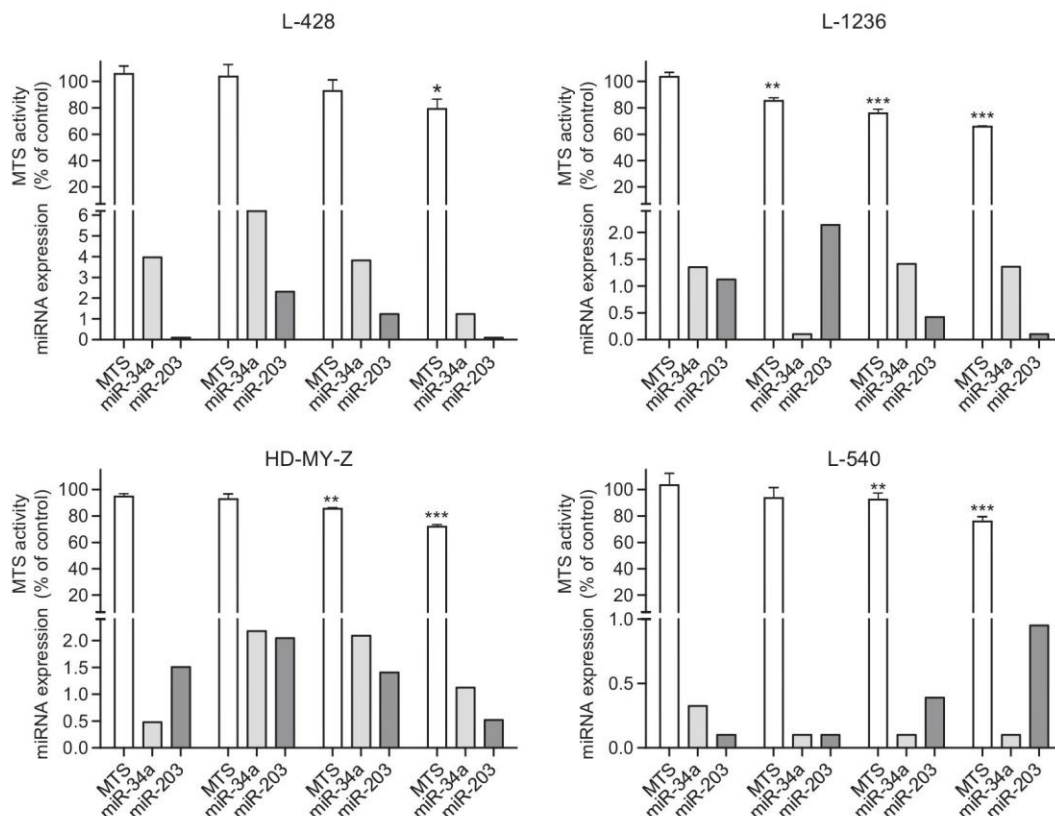


Figure 3. Proliferation analysis and study of expression of miR-203 and miR-34a after 72 h of 5-Aza-dC treatment at different doses in L-428, L-1236, HD-MY-Z and L-540 cell lines. Data are shown as mean \pm SEM of three independent replicates. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

cancer [33], respectively, too, but to our knowledge this is the first time that miR-490 has been reported to be methylated in tumors, despite it having been observed to be down-regulated in colorectal cancer [34]. Moreover, the MIR512-525 cluster, which is hypermethylated in most cell lines and hypomethylated in the placenta and in some embryonic tissues [35], was methylated both in all the cell lines and in the pool of normal B-cells in the present study, repressing the expression of the miRNAs included in the cluster. A possible limitation of this experiment is that not all primer sets used for MSP analysis can have the same PCR efficiency, since they show some weak bands that could be an unspecific reaction or a partial methylation. 5-Aza-dC, under its commercial name of decitabine (DAC), is used clinically for the treatment of myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. 5-Aza-dC is a hypomethylating agent with a dose-dependent dual mechanism of action – inhibition of cell proliferation at high doses and a DNA hypomethylation-mediated effect on gene re-expression at low doses – which affects cell differentiation, tumor suppression and stimulation of immune mechanisms [36]. In the present study, using concentrations of 5-Aza-dC that included the maximum concentrations attained in human plasma at clinical doses (C_{\max} 0.3–1.6 μM), we observed a dose-dependent antiproliferative effect at 72 h in all HL cell lines. The modest reduction of proliferation observed with 5-Aza-dC treatment in the present study may be due to the short exposure time, since the 5-Aza-dC-mediated cytotoxic effect is mainly related to its capacity to intercalate into DNA and affect only the cells in division [37]. Moreover, the two tumor suppressor miRNAs, miR-34a and miR-203, were re-expressed at low-intermediate doses of 5-Aza-dC, leading us to speculate that in clinical practice, low-intermediate doses could produce a longer-lasting anti-tumor effect.

miR-203 is hypermethylated in multiple hematological malignancies [20,22,30,31] but not in normal blood or marrow cells [30]. miR-203 has been related to multiple targets, including *ABL1* [22], *CREB1* [29] and *SOC3* [38] genes. To the best of our knowledge, this is the first study to examine miR-203 in HL. In a previous study in lymphoma cell lines [30], the methylation of miR-203 was associated with that of miR-34a. In the present study, this association held true only for the L-428 and L-1236 cell lines, but not for the HD-MY-Z and L-540 cell lines, where only miR-203, but not miR-34a, was methylated. Like miR-34a, miR-203 was re-expressed at low-intermediate doses of 5-Aza-dC. In the JEKO-1 lymphoma cell line, miR-203 re-expression led to inhibition of cellular proliferation and enhancement of cell death [31]. The gene re-expression produced by demethylating agents such as 5-Aza-dC is not random and can be reproducible [39], making it crucial to find a dose that can provide a rapid cytotoxic effect as well as stimulate the re-expression of the tumor suppressors miR-34a and miR-203.

In summary, we have shown here that HL harbors a characteristic methylation pattern in specific miRNAs, including the tumor suppressors miR-34a and miR-203, which can be reversed by 5-Aza-dC treatment. Moreover, the re-expression of miR-34a and miR-203 observed at low-intermediate doses warrants further investigation, including quantification of the

degree of methylation of these miRNAs in patient samples, to determine the potential clinical applications of our findings.

Acknowledgements

This work was supported by AECC-Catalunya. A.C. is a recipient of a grant from the Universitat de Barcelona (APIF-UB). M.D.B. is a recipient of a Rio Hortega grant (CM13/00205).

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at www.informahealthcare.com/lal.

References

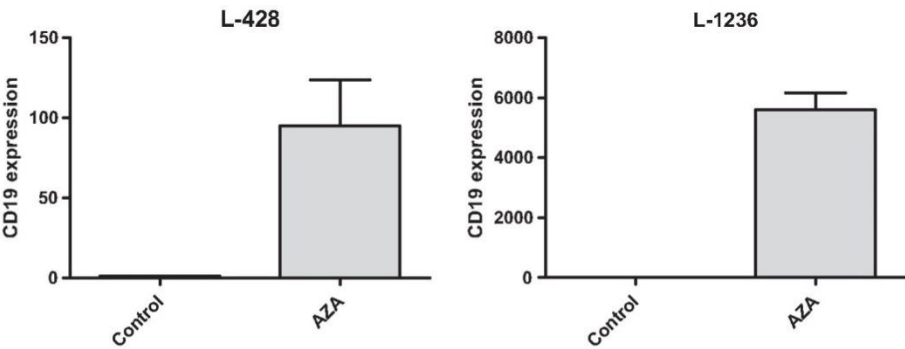
- [1] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215–233.
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–297.
- [3] Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2999–3004.
- [4] Deng S, Calin GA, Croce CM, et al. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 2008;7:2643–2646.
- [5] Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;353:1793–1801.
- [6] Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* 2008;7:853–858.
- [7] He L, Thomson JM, Hemann MT, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005;435:828–833.
- [8] Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, et al. Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 2009;460:529–533.
- [9] Saito Y, Jones PA. Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* 2006;5:2220–2222.
- [10] Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008;358:1148–1159.
- [11] Robertson KD. DNA methylation and chromatin – unraveling the tangled web. *Oncogene* 2002;21:5361–5379.
- [12] Rodriguez-Paredes M, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med* 2011;17:330–339.
- [13] Carmona FJ, Esteller M. DNA methylation in early neoplasia. *Cancer Biomark* 2011;9:101–111.
- [14] Kuppers R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 2009;9:15–27.
- [15] Ushmorov A, Leithauser F, Sakk O, et al. Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006;107:2493–2500.
- [16] Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, et al. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13556–13561.
- [17] Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:1424–1429.
- [18] Artells R, Navarro A, Diaz T, et al. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of intestinal myofibroblasts during the early organogenesis of the human small intestine. *Anat Rec* 2011;294:462–471.
- [19] Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, et al. miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2010;31:766–776.
- [20] Craig VJ, Cogliatti SB, Rehauer H, et al. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res* 2011;71:3616–3624.
- [21] Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, et al. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:15472–15477.
- [22] Bueno MJ, Perez de Castro I, Gomez de Cedron M, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13:496–506.

- [23] Van Vlierberghe P, De Weer A, Mestdagh P, et al. Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs. *Br J Haematol* 2009;147:686-690.
- [24] Gibcus JH, Tan LP, Harms G, et al. Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia* 2009;11:167-176.
- [25] Navarro A, Gaya A, Martinez A, et al. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2008;111:2825-2832.
- [26] Navarro A, Diaz T, Martinez A, et al. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 2009;114:2945-2951.
- [27] Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, et al. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 2008;7:2591-2600.
- [28] Chim CS, Wong KY, Qi Y, et al. Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. *Carcinogenesis* 2010;31:745-750.
- [29] Wong KY, Liang R, So CC, et al. Epigenetic silencing of MIR203 in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2011;154:569-578.
- [30] Chim CS, Wong KY, Leung CY, et al. Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological malignancies. *J Cell Mol Med* 2011;15:2760-2767.
- [31] Chim CS, Wan TS, Wong KY, et al. Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J Transl Med* 2011;9:197.
- [32] de Souza Rocha Simonini P, Breiling A, Gupta N, et al. Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Res* 2010;70:9175-9184.
- [33] Grady WM, Parkin RK, Mitchell PS, et al. Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27:3880-3888.
- [34] Hamfjord J, Stangeland AM, Hughes T, et al. Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PLoS One* 2012;7:e34150.
- [35] Tsai KW, Kao HW, Chen HC, et al. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* 2009;4:587-592.
- [36] Saba HI. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Ther Clin Risk Manag* 2007;3:807-817.
- [37] Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, et al. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One* 2010;5:e9001.
- [38] Ru P, Steele R, Hsueh EC, et al. Anti-miR-203 upregulates SOCS3 expression in breast cancer cells and enhances cisplatin chemosensitivity. *Genes Cancer* 2011;2:720-727.
- [39] Hagemann S, Heil O, Lyko F, et al. Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS One* 2011;6:e17388.

Supplementary material available online

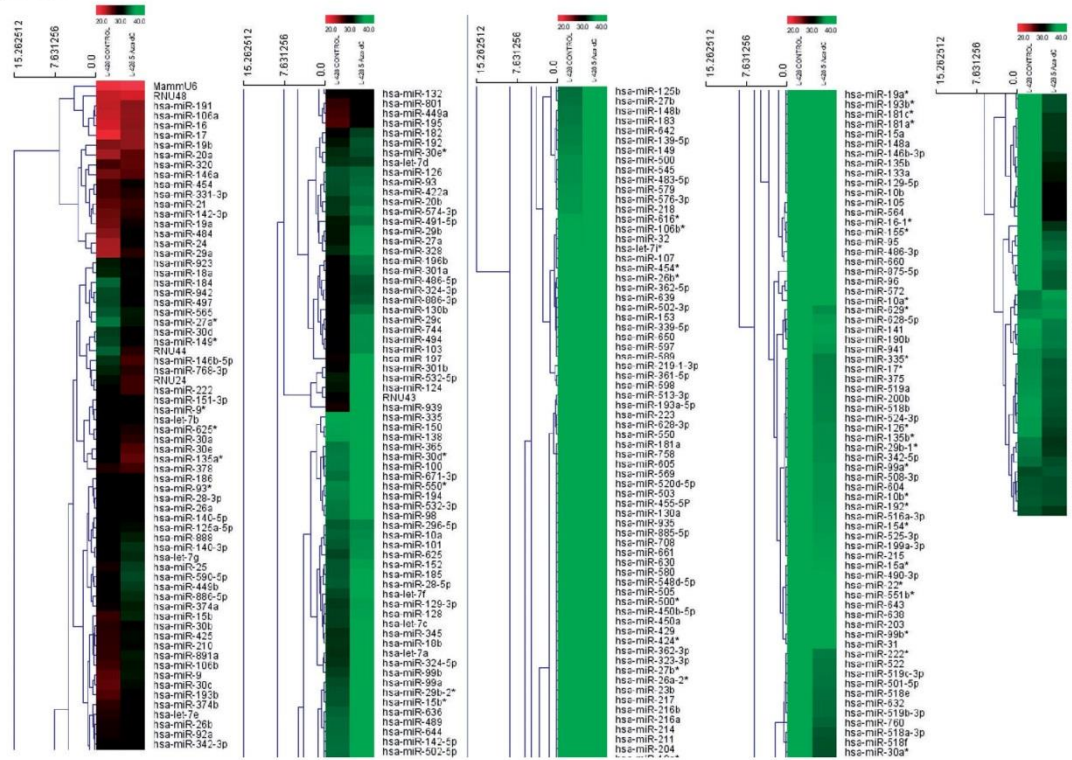
Supplementary Table I and Figures 1-2 showing further data

Supplementary Table I. Sequences of primers used for the MSP analysis.		
miRNA gene	Primer	Sequence
MIR34A	hsa-mir34UF	GGTTTIGATTTTTTTTGTATTGATG
	hsa-mir34UR	CCAAACCCCIAAACCACAACACA
	hsa-mir34MF	TTTIGATTTTTTTTCGTATCGACG
	hsa-mir34M5R	AAACCCCIAAACCGCGACGCG
MIR203	hsa-mir-203MR	AAACGACTAAACTCCGAACG
	hsa-mir-203MF	GGGTCGTGGAGGATTAGTC
	hsa-mir-203UR	AAACAATAAACTCCAAACA
	hsa-mir-203UF	GGGTTGTGGAGGATTAGTT
MIR342	hsa-miR-342MF	TAT TTT CGT TCG TTT CGT TTT TC
	hsa-miR-342MR	AAA TAC GCG CGT TAC TAT TCG
	hsa-miR-342UF	TAT TTT TGT TTG TTT TGT TTT TTG T
	hsa-miR-342UR	TAA AAT ACA CAC ATT ACT ATT CAC C
MIR490	hsa-miR-490MF	TTG TTT TCG TTC GTT TTT AGT ATT C
	hsa-miR-490MR	GAC AAT TCT ACT AAC TTT ACG CGT T
	hsa-miR-490UF	GTT TTT GTT TGT TTT TAG TAT TTG T
	hsa-miR-490UR	CAA CAA TTC TAC TAA CTT TAC ACA TT
MIR512-525 cluster	hsa-miR-500XMF	TAC GGT GGT TCG TAT TAG AGT ATT C
	hsa-miR-500XMR	GTA AAA ACG AAA TTT CAC CAC GT
	hsa-miR-500XUF	TGG TGG TTT GTA TTA GAG TAT TTG T
	hsa-miR-500XUR	CAT AAA AAC AAA ATT TCA CCA CAT T
MIR375	hsa-miR-375MF	AGA GTA TAC GGA GTT CGG GTT TC
	hsa-miR-375MR	CTA CGA CTA ACA CGT CGA CGA C
	hsa-miR-375UF	AGT ATA TGG AGT TTG GGT TTT GG
	hsa-miR-375UR	CAT CTA CAA CTA ACA CAT CAA CAA C

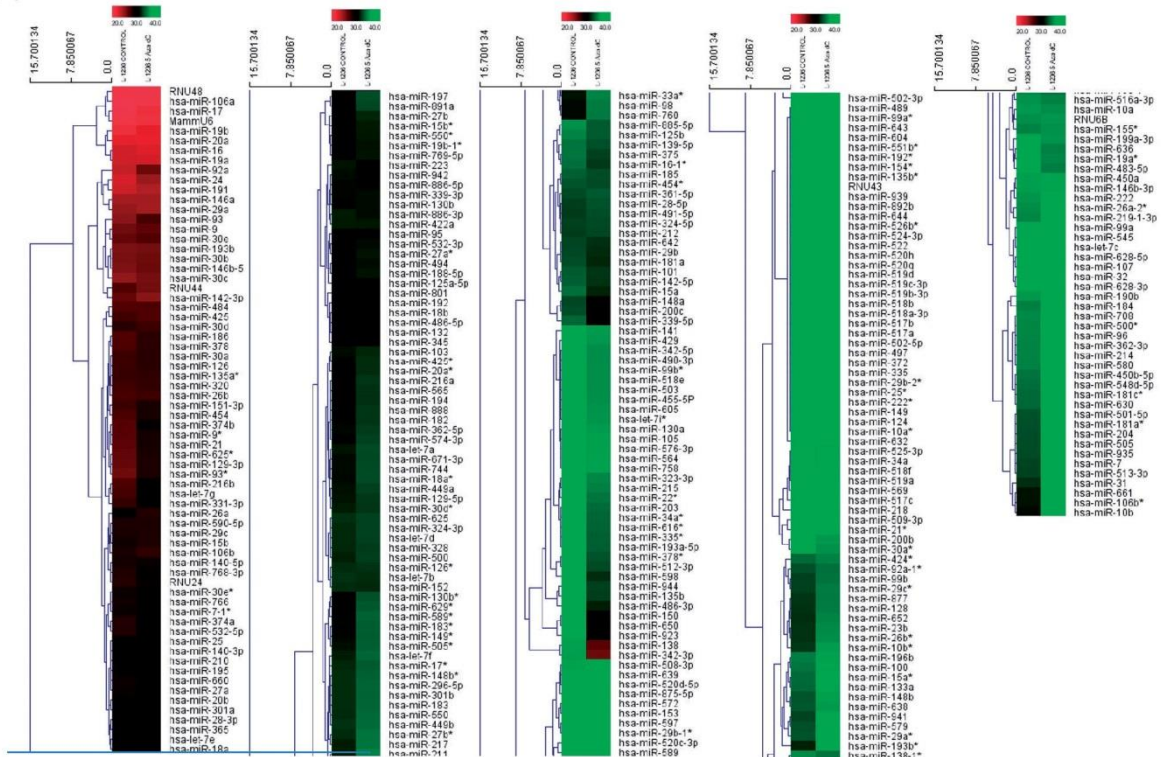


Supplementary Figure 1.Expression levels of CD19 gene before and after 5-Aza-dC treatment.

(a) L-428



(b) L-1236



Supplementary Figure 2. Magnification of heat maps of miRNA expression before and after 5-Aza-dC treatment.

3.2. Article segon: “*PiwiRNA-651 as marker of treatment response and survival in classical Hodgkin lymphoma*”

Resum

Els piRNAs són ARNs no codificants petits de 26-32 pb i estan processats per les proteïnes PIWI, una subfamília de les proteïnes Argonata, la funció principal de les quals és controlar l'estabilitat genòmica, que entre altres causes, està deguda a la hipometilació global que es produeix durant el desenvolupament tumoral. Fins fa poc, es creia que la via PIWI/piRNA estava limitada a les cèl·lules germinals, però recentment s'ha demostrat que participen en el procés de tumorigènesi. Aquest treball pretén estudiar la importància de la via PIWI/piRNA en el LHc.

Les proteïnes PIWIL1, PIWIL2 i PIWIL4 s'han analitzat per immunohistoquímica, nivells d'expressió d'ARNm i Western Blot. Vam seleccionar per al nostre estudi tres piRNAs descrits com a sobreexpressats en tumors sòlids. Aquests s'han analitzat per PCR a temps real i hibridació *in situ*. S'han utilitzat 4 línies cel·lulars de LHc (L-428, L-1236, HDLM2 i L-540), 94 mostres de gangli de pacients (VIH-) amb LHc i 12 ganglis reactius (GRs). S'han recol·lectat prospectivament mostres de sèrum al diagnòstic i a la resposta completa d'11 pacients amb LHc i 10 controls sans.

Es detecten nivells baixos de PIWIL1 en les línies cel·lulars de LHc, però no en les cèl·lules B controls. En les mostres de pacients, detectem PIWIL1 en el citoplasma de les cèl·lules HRS en un terç dels pacients analitzats. PIWIL2 i PIWIL4 es troben infraexpressats en les línies de LH en comparació amb les cèl·lules B. En totes les mostres analitzades de pacients detectem PIWIL2 i 4. Els 3 piRNAs seleccionats (piR-651, piR-20365 i piR-20582) s'expressen en totes les mostres analitzades i estan significativament sobreexpressats en LHc en comparació als GRs. De forma interessant, els pacients amb nivells baixos de piR-651 presenten una menor taxa de resposta complerta ($p=0.002$) i una pitjor supervivència global ($p=0.02$). L'anàlisi de piR-651 en mostres de sèrum mostra que es troba infraexpressat al diagnòstic ($p=0.01$) però recupera els nivells normals a l'assolir la resposta complerta ($p=0.05$).

La via PIWI/piRNA està activa en el procés de tumorigènesi en el LHc. Els tres piRNAs estudiats estan sobreexpressats en el LHc. Nivells baixos del piR-651 s'associen a unes supervivències lliure de malaltia i global més curtes, així com a una pitjor resposta a tractament. L'expressió dels piRNAs estudiats pot ser detectada en sèrum i els nivells de piR-651 modulen amb el tractament, suggerint el seu ús com a marcador de resposta.

Research Paper

PiwiRNA-651 as marker of treatment response and survival in classical Hodgkin lymphoma

Anna Cordeiro¹, Alfons Navarro¹, Anna Gaya², Marina Díaz-Beyá², Blanca Gonzalez-Farré³, Joan Josep Castellano¹, Dolors Fuster¹, Carmen Martínez², Antonio Martínez³, Mariano Monzó¹

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²Hematology Department, Hospital Clinic Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

³Hematopathology Section, Hospital Clinic Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Correspondence to: Alfons Navarro, email: anavarroponz@ub.edu

Keywords: Hodgkin lymphoma, non-coding RNAs, piwiRNAs, piR-651, Piwi proteins

Received: March 04, 2016

Accepted: May 26, 2016

Published: June 14, 2016

ABSTRACT

PiwiRNAs, small non-coding RNAs processed by Piwi proteins, are involved in maintaining genome stability in germline cells. Recently, piwiRNA expression has been identified in some tumors. We have examined the potential reactivation of the Piwi/piwiRNA pathway in classical Hodgkin lymphoma (cHL). We found that Piwi proteins and three selected piwiRNAs, including piR-651, were expressed in cHL patients and cell lines, indicating that the Piwi/piwiRNA pathway is active in cHL. Interestingly, low levels of piR-651 were associated with lack of complete response to first-line treatment, as well as shorter disease-free and overall survival in a cohort of 94 cHL patients. At diagnosis, piR-651 was underexpressed in cHL serum samples compared to healthy controls, while after complete remission, piR-651 levels increased to levels similar to healthy controls. This is the first evidence that piwiRNAs are active in tumor and serum samples and impact prognosis in cHL.

INTRODUCTION

Classical Hodgkin lymphoma (cHL) comprises 11% of all lymphomas and is characterized by the presence of few tumoral cells, the so called Hodgkin Reed-Sternberg (HRS) cells, surrounded by a reactive microenvironment [1]. In cHL lymph nodes, the tumor bulk is mostly composed of T (CD4+ and cytotoxic T cells) and B cells, and macrophages and other cell types that crosstalk with the HRS cells through characteristic surface molecules expressed in both HRS cells and reactive cells and through secreted cytokines and chemokines [2]. Most cHL patients can be cured using current treatment strategies. However, about 20% of the patients will die after relapse or progressive disease, indicating a need to identify prognostic markers that improve the International Prognostic score (IPS) [3, 4]. Several approaches to extend our knowledge of cHL biology and to identify prognostic biomarkers have been addressed, including the study of purified HRS cells [5], the study of the complete lymph node [6, 7] and the study of circulating biomarkers [8]. Recently, expression profiling of the complete

lymph node identified a tumor-associated macrophage signature associated with outcome in cHL patients [9], demonstrating that the analysis of both tumor cells and the microenvironment can be an effective approach to understanding the behavior of cHL patients [10].

Non-coding RNAs have recently emerged as useful biomarkers, especially the small non-coding RNAs that are involved in post-transcriptional regulation mediated by Argonaute proteins. Argonaute proteins consist of two families: the Argonaute subfamily, which binds to microRNAs and siRNAs and the Piwi subfamily which binds exclusively to piwiRNAs (piRNAs) [11]. piRNAs are small non-coding RNAs (26-32nt), first discovered in 2006 simultaneously by five groups as being expressed exclusively in mammalian testes [12–16]. piRNAs are generated by two different biogenesis pathways, known as the primary and secondary pathways (Supplementary Figure S1). In the primary pathway, after transcription the piRNA precursors are processed and transported to the cytoplasm where they are finally loaded onto Piwi1 and Piwi2 proteins. In the secondary pathway (also known as the “ping-pong” cycle), Piwi2 and Piwi4 bind in different

steps to piRNAs generated by the primary pathway. During the ping-pong cycle, the piRNA binds by sequence complementarity to a retrotransposon, producing at the end of the cycle the degradation of the target and a new copy of the piRNA [17]. This pathway, which depends on the abundance of both the specific piRNA and its target, leads to a selective amplification of piRNAs derived from active transposons. According to the latest update on piRNABank (2015) [18], a database which provides comprehensive information on piRNAs, more than 23,000 piRNAs have been identified in humans. In adults, most of these piRNAs are only expressed in germline tissues, where they are crucial for fertility, as evidenced by the spermatogenesis defects observed in mice knockouts for Piwi proteins [19, 20]. In the germline, the key function of piRNAs is the repression of transposons, in order to prevent mutations caused by these mobile elements [21]. They regulate transposons at different levels, including the degradation of RNA [21] through the secondary pathway and the regulation of transposon expression by DNA methylation or histone modification [22]. Other functions have also been attributed to piRNAs, including the post-transcriptional regulation of mRNAs [23].

Recently, piRNAs have been detected outside of germinal tissues [24], and interestingly, some of them are deregulated in tumor tissues. To date, only a few studies have analyzed the role of piRNAs in tumorigenesis and few piRNAs have been identified. piR-651, piR-4987, piR-20365, piR-20489, piR-20582, piR-932, piR-Hep1, and piR-823 have been shown to be upregulated in several tumors [25–28]; while only piR-823 has been described as downregulated [29]. However, the specific prognostic impact of piRNAs remains to be elucidated.

In the present work, we have investigated if the Piwi/piRNA pathway is active in cHL by studying the expression of Piwi proteins and the expression of selected piRNAs: piR-651, piR-20365 and piR-20582 [25, 26, 30]. We have found that the Piwi/piRNA pathway is indeed active in cHL and that the study of piRNAs can be a good source of prognostic markers.

RESULTS

Piwi/piRNA pathway is active in cHL

To investigate if the Piwi/piRNA pathway was active in cHL, we analyzed the expression of *PIWIL1*, *PIWIL2* and *PIWIL4* and that of piR-651, piR-20365 and piR-20582 [25, 26, 30].

PIWIL1, *PIWIL2* and *PIWIL4* showed different patterns of expression in the four cHL cell lines. *PIWIL1* was mostly expressed in L-1236 and HDLM2 (Figure 1A), while *PIWIL2* and *PIWIL4* were expressed in all four cell lines (Figure 1B–1C). When we compared the expression in the cell lines with those in B-cells from peripheral blood from healthy controls, we observed that *PIWIL2*

and *PIWIL4* were downregulated in the HL cell lines, but *PIWIL1* was not expressed in the B-cells.

The immunohistochemical analysis of cHL patient samples showed that *Piwi1* was expressed in only 5 of 15 cases, exclusively in the cytoplasm of the HRS cells (Figure 2A–2B). In contrast, *Piwi2* was detected in all the samples, both in the HRS cells and in the reactive microenvironment (Figure 2C–2D). Finally, *Piwi4* was detected in 11 of 15 cases, only in the cytoplasm of the HRS cells (Figure 2E–2F).

All three piRNAs were expressed in all four cell lines and in all tumor samples (Figure 3). Moreover, piR-651 ($p < 0.0001$) and piR-20582 ($p = 0.0003$) were significantly upregulated in patient lymph nodes compared to RLN, while piR-20365 ($p = 0.0505$) showed a trend to upregulation (Figure 3A–3C).

piR-651 and clinical outcome

Only piR-651 expression was associated with clinical outcome. Expression levels were dichotomized using the cutoff identified by MaxStat (cutoff=0.25; mean expression of low group: -0.046 [range: -0.37-0.18]; mean expression of high group: 1.27 [range: 0.26-6.11]). Low expression levels of piR-651 were associated with shorter DFS (Mean DFS: 83.3 vs. 197.9 months, $p = 0.0154$) and shorter OS (Mean OS: 117.2 vs. 207.2 months; $p = 0.0218$) (Figure 4A–4B). In the multivariate analysis, including all the individual clinical factors included in the International Prognostic Score (IPS) [3], low piR-651 emerged as an independent prognostic factor for DFS (OR, 4.21; 95% CI=1.342-13.209; $p = 0.014$) and OS (OR, 2.836; 95% CI=1.042-7.717; $p = 0.041$) (Table 1).

In the subset of 56 advanced-stage patients, piR-651 retained its impact on both DFS ($p = 0.003$) and OS ($p = 0.007$), while the IPS was significant only in OS ($p = 0.04$). In the multivariate analyses including the IPS score and piR-651, piR-651 emerged as an independent prognostic factor for both DFS (OR, 6.52; 95% CI=1.72-24.77; $p = 0.006$) and OS (OR, 2.92; 95% CI=1.07-7.93; $p = 0.036$), while IPS was identified as a prognostic factor for OS (OR, 3.1; 95% CI=1.13-8.5; $p = 0.028$).

piR-651 is associated with complete response

When patients were classified as responders or non-responders to first-line treatment, non-responders had lower levels of piR-651 expression in lymph nodes (T-test $p = 0.0022$) (Figure 4C). Using ROC curves to determine the capacity of piR-651 to distinguish responders vs non-responders to first line treatment, we found that piR-651 significantly discriminates between responders and non-responders (AUC: 0.741, 95% CI 0.594-0.888; $p = 0.010$). When piR-651 expression was analyzed as a dichotomous variable (cutoff: 0.25; sensitivity: 0.84; 1-specificity: 0.45), lower levels of piR-651 were also associated with

treatment failure. Only 7.2% of patients with high piR-651 expression had treatment failure, compared to 66.7% of those with low expression (Fisher's Exact test, $p=0.009$).

Moreover, we performed a multivariate analysis including Age (≤ 45 vs >45), number of cycles of chemotherapy (≤ 4 vs >4), radiotherapy (Yes vs No), stage (I-II vs III-IV) and piR-651 (Low vs High). Low piR-651 emerged as an independent prognostic factor for treatment failure (OR, 11.680; 95% CI=1.718-79.423; $p=0.012$) together with the ≤ 4 cycles of chemotherapy administered (OR, 11.761; 95% CI=1.497-92.406; $p=0.019$).

piR-651 levels in serum samples

When we studied piR-651 expression in prospectively collected serum samples, we observed that at diagnosis piR-651 was underexpressed in cHL samples ($n=11$) compared to serum from healthy controls ($n=10$) ($p=0.0137$). Interestingly, after CR ($n=9$), piR-651 showed a trend to upregulation in serum in comparison to diagnostic samples ($p=0.0594$), reaching levels similar to those of healthy controls. At CR, no significant differences between patients and healthy controls were observed ($p=0.296$) (Figure 5).

piR-651 is expressed in HRS cells

To verify that the prognostic role of piR-651 was associated with its expression in HRS cells, we performed *in situ* hybridization analysis in lymph node tissue sections of four patients. piR-651 was expressed in normal follicles (Figure 6A) at low levels in the mantle cells and

overexpressed in large centroblasts in the reactive germinal centers (Figure 6B). Moreover, piR-651 was highly expressed in the cytoplasm of HRS cells (Figure 6C–6D).

DISCUSSION

Small non-coding RNAs have emerged as important post-transcriptional regulators, especially siRNAs and microRNAs [31]. However, piRNAs have been understudied because until recently they were thought to be expressed exclusively in germinal tissues and early embryonic development and silenced in differentiated tissues [32]. However, recent findings on the detection of piRNAs in several tumors have shed light on the importance of this forgotten small non-coding RNA group [30, 33]. In the present work, we have investigated whether the Piwi/piRNA pathway could be involved in the tumorigenesis process in cHL. We first studied *PIWIL1*, *PIWIL2* and *PIWIL4*, which bind specifically to piRNAs and participate in their biogenesis [34]. The study of these genes in cHL cell lines showed two different expression patterns. *PIWIL1* expression levels were very low in comparison to those of *PIWIL2* and *PIWIL4*. Moreover, *PIWIL1* expression was only detected at significant levels in one of four cHL cell lines. In contrast, *PIWIL2* and *PIWIL4* were expressed in all four cHL cell lines. This difference may be due to their participation in the two different biogenesis pathways [35]. *PIWIL1* acts exclusively in the primary biogenesis pathway, while *PIWIL4* is active only in the secondary pathway and *PIWIL2* acts in both. The differences in

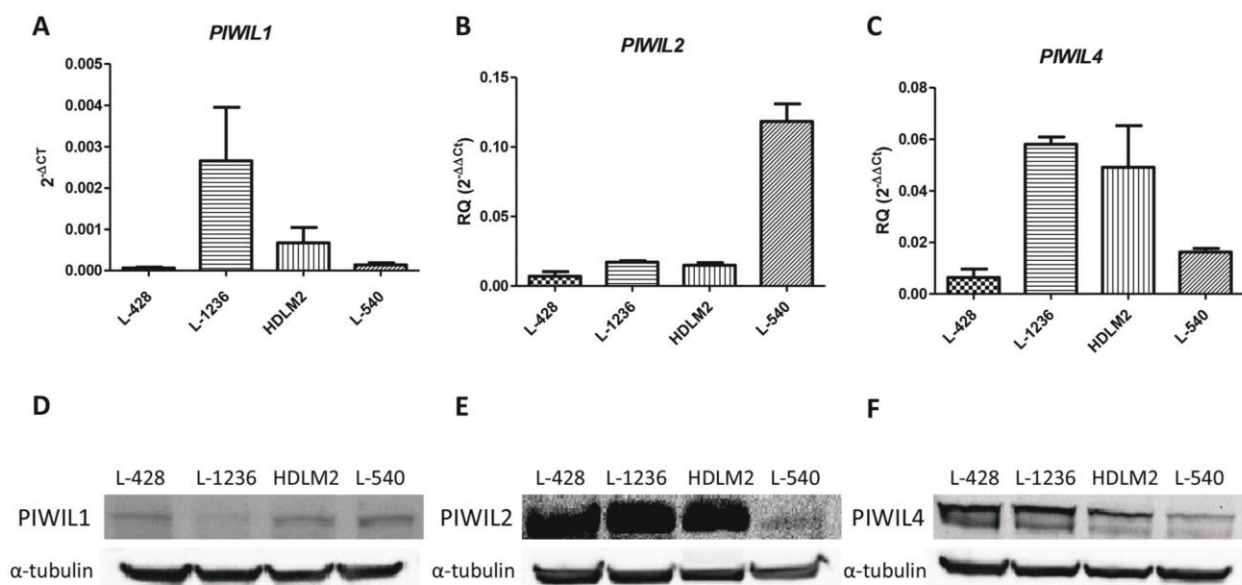


Figure 1: *PIWIL1*, *PIWIL2* and *PIWIL4* expression in cHL. *PIWIL1* A. *PIWIL2* B. and *PIWIL4* C. mRNA expression in four cHL cell lines. *PIWIL2*-4 were showed as RQ calibrated with the expression of peripheral blood B-cells, while *PIWIL1* was showed in 2^{-ΔCt} since it is not expressed in B-cells. The graph shows the median and SEM of three technical replicates. Western blot for *PIWIL1* D. *PIWIL2* E. and *PIWIL4* F. in HL cell lines.

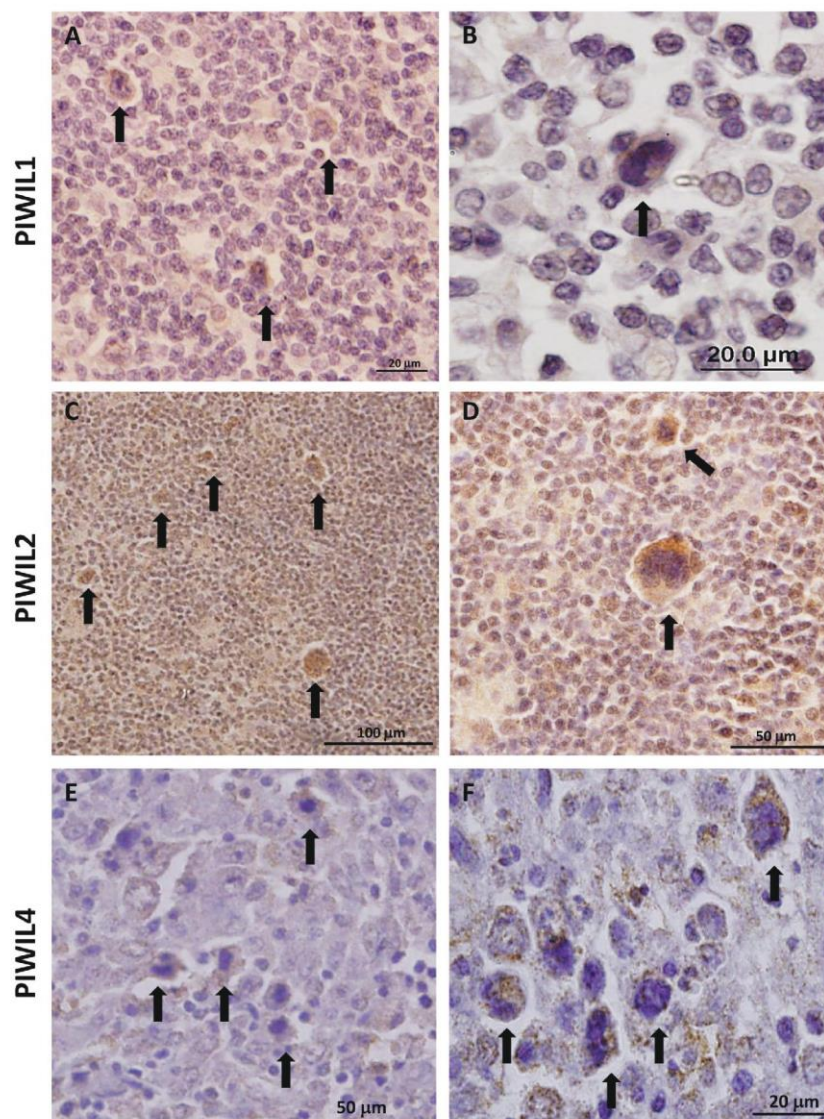


Figure 2: Immunohistochemistry of protein expression of Piwil1 A, B, Piwil2 C, D, and Piwil4 E, F in patient lymph nodes. Arrows indicate representative HRS cells.

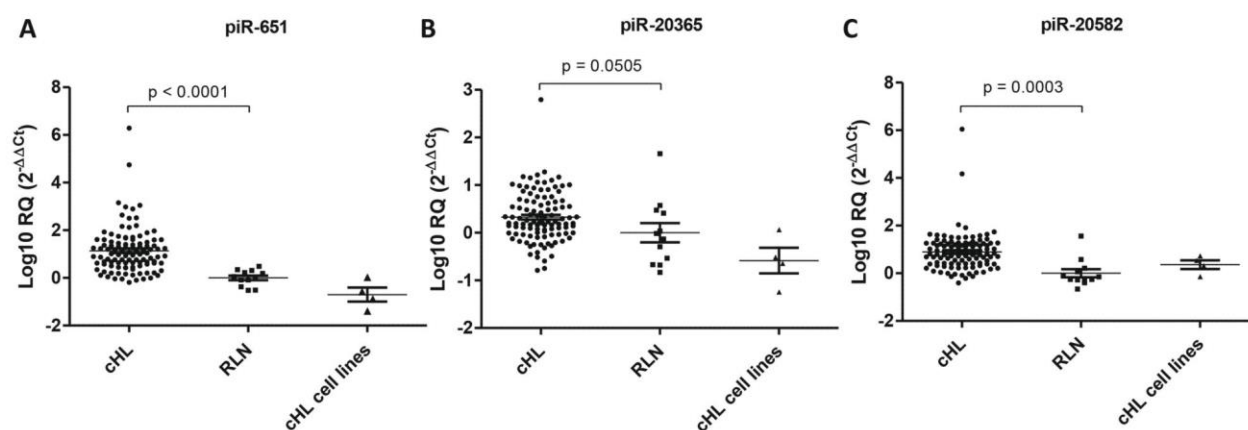


Figure 3: Expression levels of three selected piRNAs. Expression levels of piR-651 A, piR-20365 B, and piR-20582 C, in 94 cHL lymph nodes, 12 reactive lymph nodes (RLN) and four cHL cell lines.

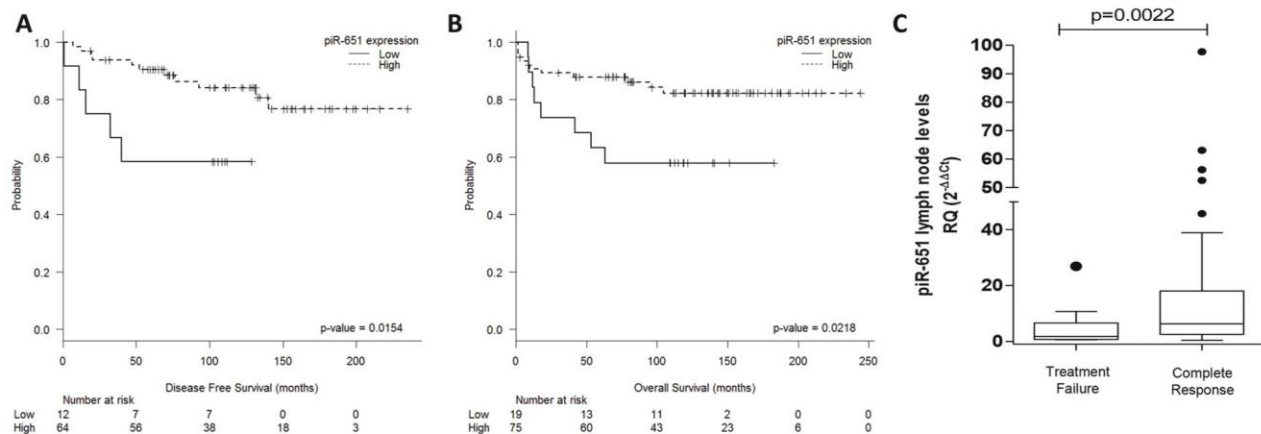


Figure 4: PiR-651 impacts outcome in cHL patients. Disease-free survival **A.** and overall survival **B.** according to piR-651 levels. **C.** piR-651 levels according to response to first-line treatment (Treatment failure vs Complete response).

Table 1: Multivariate analyses

Disease-Free Survival	Odds Ratio (95% CI)	P
Male sex	2.855 (0.887-9.187)	0.078
Age>45 years	2.478 (0.579-10.612)	0.221
Stage III-IV	1.320 (0.324-5.381)	0.699
Hemoglobin <105 g/L	8.458 (0.974-73.450)	0.053
Albumin <40g/L	3.274 (1.058-10.136)	0.040
White-cell count >15,000/mm ³	2.113 (0.413-10.808)	0.369
Lymphocyte count <600/mm ³ or <8%	<0.001 (<0.001-<0.001)	0.986
Low piR-651 expression	4.210 (1.342-13.209)	0.014
Overall Survival	Odds Ratio (95% CI)	P
Male sex	1.535 (0.564-4.177)	0.402
Age>45 years	13.681 (4.281-43.726)	<0.0001
Stage III-IV	2.107 (0.583-7.620)	0.256
Hemoglobin <105 g/L	0.820 (0.259-2.598)	0.736
Albumin <40g/L	2.828 (0.996-8.032)	0.051
White-cell count > 15,000/mm³	4.282 (1.332-13.762)	0.015
Lymphocyte count <600/mm ³ or <8%	2.782 (0.810-9.553)	0.104
Low piR-651 expression	2.836 (1.042-7.717)	0.041

PIWIL1 expression in the different cell lines may thus indicate that the primary pathway is not always active. The primary pathway is in charge of generating new piRNA sequences, while the secondary pathway helps to maintain the existent piRNA pool in the cell [35]. Interestingly, in several solid tumors, the reactivation of *PIWIL1* expression, associated with worse prognosis, could be related to a stem cell phenotype [36–39]. Similarly, *PIWIL1* is expressed in CD34+ hematopoietic stem cells [40]. When we studied Piwi protein expression

in patient lymph nodes, we observed a similar pattern to that in cell lines. Piwil1 was only detected in the cytoplasm of tumor cells in few cases, while Piwil2 and Piwil4 were detected in most of the cases. Moreover, Piwil2 expression was not exclusive to HRS cells but was also detected in most of the microenvironment cells, indicating that the secondary pathway is not exclusive to tumor cells. Along these same lines, *PIWIL2* and *PIWIL4* have been detected in other tumors as well in their normal counterpart [36, 41].

To further explore the activity of the Piwi/piRNA pathway in cHL, we investigated if three piRNAs (piR-651, piR-20365, piR-20582) that had previously been identified as overexpressed in solid tumors [25, 26] could be detected in cHL. The three piRNAs were detected in all the samples, including lymph nodes from cHL patients, reactive lymph nodes used as controls, and the four cHL cell lines. The detection of the piRNAs in control samples indicated that probably a piRNA pool is maintained in somatic tissues [32, 33], including lymph nodes.

In fact, the study by *in situ* hybridization of piR-651 showed that it was expressed not only in HRS cells but also in normal follicles, especially at centroblasts. Interestingly, piR-651 expression in patient lymph nodes was significantly higher than in RLN suggesting that this upregulation is due to the presence of the population of HRS cells, which are expressing piR-651 and at the same time producing changes in the surrounding cells that lead to an increase of global piR-651 levels in the HL lymph node.

As previously found in other tumors [25, 26], the three piRNAs were overexpressed in the tumor samples.

We then examined the potential correlation of the expression of these piRNAs in lymph node samples with patient outcome and found that piR-651 emerged as an independent prognostic marker for DFS and OS. The patients with low levels of piR-651 had worse outcome. Remarkably, patients that did not achieve treatment response had lower levels of piR-651.

In the same line, the analysis of piR-651 in serum samples showed that piR-651 levels were downregulated at diagnosis but increased after treatment when the patient achieved CR. Cui et al. showed that piR-651 analyzed in mononuclear cells from peripheral blood from gastric cancer patients was also lower in comparison with control samples [42]. This leads us to speculate that the expression of piR-651 detected in serum could come from circulating cells rather than from tumor cells and the downregulation observed in the patients could reflect differences in the peripheral blood populations associated to the presence of the lymphoma. It has previously been reported that immune suppression associated with the lymphoma pathogenesis may be found systemically resulting from an altered monocyte phenotype in patients with lymphoma [43].

Similar results have been observed when studying serum expression of microRNAs in other tumors, including multiple myeloma, where several miRNAs were underexpressed in serum at diagnosis but increased at CR, and lower levels in serum were associated with shorter progression-free survival [44]. In cHL, only one previous study has examined microRNAs in plasma samples, and the authors identified several microRNAs, including miR-494 and miR-1973, whose levels were upregulated at diagnosis and decreased at CR [8]. This is in line with our results and indicates that the analysis of small non-coding RNAs in serum/plasma samples could be useful to monitor treatment response.

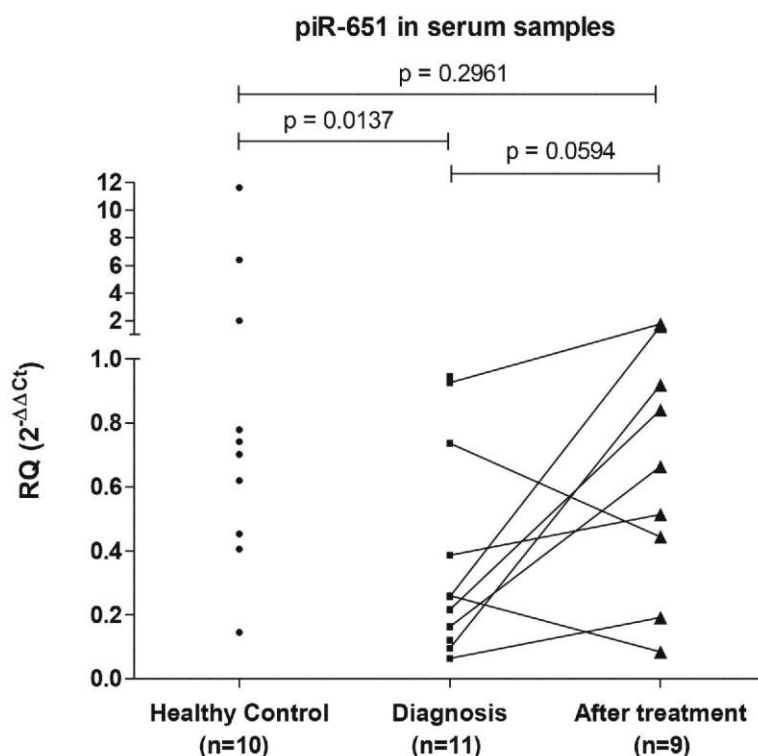


Figure 5: PiR-651 levels in serum samples. PiR-651 was studied in serum samples from healthy controls and from cHL patients prospectively collected. From cHL patients paired samples at diagnosis and at CR after first line treatment were included.

Contrary to our results, piR-651 was identified as an oncogene in gastric cancer, where Cheng and coworkers demonstrated *in vitro* that the inhibition of piR-651 was associated with a decrease in cell growth due to an arrest in G2/M phase of gastric cancer cell lines [25]. In contrast, though we have also observed overexpression of piR-651 in patient samples in comparison with RLN, low levels of piR-651 were associated with worse patient outcome. It has previously been demonstrated that other small non-coding RNAs, such as microRNAs, can play a dual role as an oncogene or a tumor suppressor gene according to the cellular context [45]. Treatment has been shown to produce changes in the cellular context affecting the function of some microRNAs, which become oncogenes or tumor suppressor genes when treatment is administered

by a target-dependent mechanism [46]. Like microRNAs, piRNAs are involved in post-transcriptional regulation through a similar mechanism based on targeting RNAs by base pairing between complementary sequences that leads to translational repression [23]. To date, only a few studies have associated piRNAs and cancer, most of which have shown that piRNAs are overexpressed and act as oncogenes [25–29, 41, 47]. However, piRNAs can also play a dual role depending on the tumor. For example, piR-823 has been shown to act as a tumor suppressor in gastric cancer [29] and as an oncogene in multiple myeloma [28].

In summary, we show here for the first time that the Piwi/piRNA pathway is active in cHL. Moreover, we have identified a piR-651 as a potential biomarker that can be detected in serum. piR-651 may act as a tumor

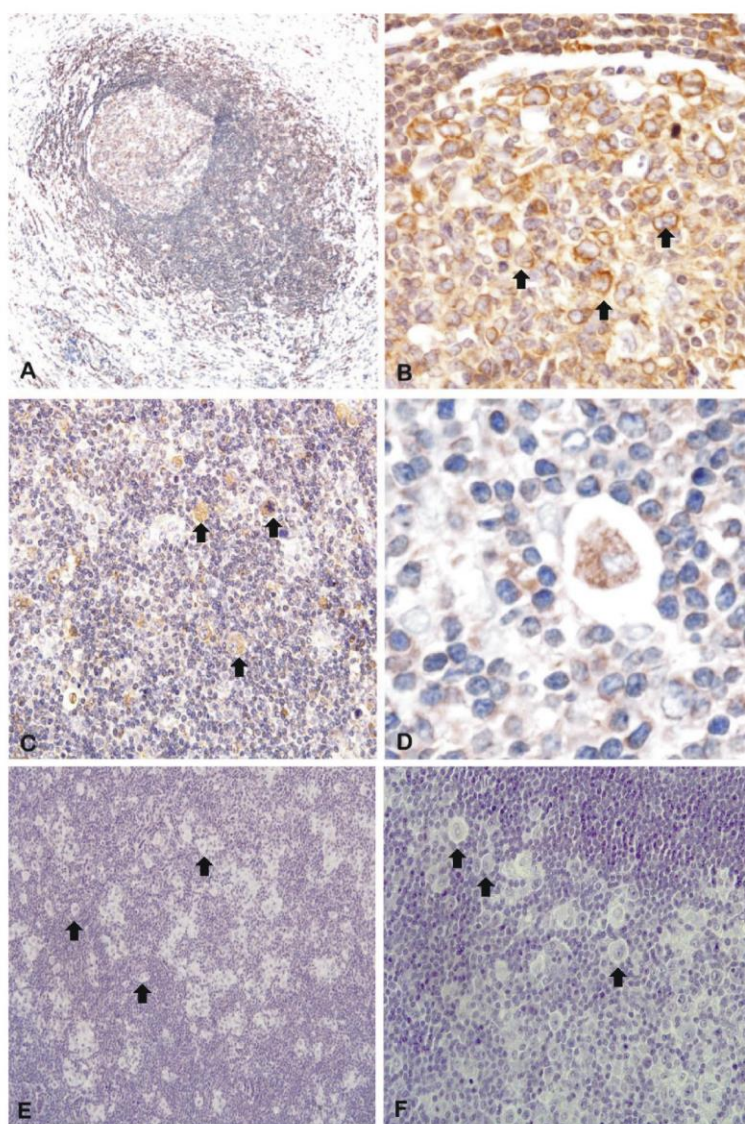


Figure 6: *In situ* hybridization of piR-651. Arrows indicate representative HRS cells. **A.** piR-651 was expressed in normal follicles at low levels in the mantle cells and **B.** overexpressed in large centroblasts in the reactive germinal centers. **C-D.** piR-651 was highly expressed in the cytoplasm of HRS cells. **E-F.** negative control.

suppressor since patients with low piR-651 levels had shorter OS, associated with worse response to first-line treatment. Interestingly, piR-651 levels in serum increase at response to treatment. Further investigation in a larger cohort of patients is warranted to confirm these findings and to further validate the potential importance of piR-651 as a prognostic marker in cHL.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Ninety-four patients diagnosed with cHL at a single institution between February 1994 and December 2010 were included in the analysis. The only exclusion criterion was HIV+. Median age was 38 years, and 48% were male. The most frequent histological subtypes were nodular sclerosis (65%) and mixed cellularity (19%). Using criteria previously described [7], we found that Epstein-Barr virus was present in 30% of the samples. The most frequent first-line treatments were ABVD (62%) and MOPPABV (29%). After first-line treatment, 76 patients (81%) achieved complete remission, two (2%) partial remission, and 11 (11.7%) treatment failure, while five patients (5.3%) died before response evaluation (Table 2). With a median follow-up of 133.5 months (range, 2.8-244.1 months), overall survival was 78.7%. Twelve reactive lymph nodes were used as controls. Serum samples from eleven prospectively collected cHL patients at diagnosis and nine paired samples at complete response and from 10 healthy controls were used to study the expression of piRNAs in serum. Approval for this study was obtained from the Institutional Review Board of Hospital Clinic, Barcelona. Informed consent was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Cell culture

Four cHL cell lines were used: L-428, L-1236, L-540 and HDLM2 (DSMZ - the German Resource Centre for Biological Material). The cell lines used were obtained from DSMZ at the beginning of the current work and tested for mycoplasma contamination at least once time at month. The L-428 and L-1236 cell lines were cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (Invitrogen, Paisley, UK); the L-540 and HDLM2 cell lines were cultured in RPMI 1640 containing 20% fetal bovine serum (Invitrogen).

RNA extraction

Total RNA was obtained from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lymph nodes as previously described [6, 7] using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies, Foster City, CA). All patient lymph nodes were obtained at diagnosis. Total

Table 2: Demographic and clinical characteristics of cHL patients (N=94)

Variable	N (%)
Median age, yrs (range)	34 (15–89)
≤45	68 (72.3)
>45	26 (27.7)
Male sex	45 (47.9)
Histologic subtype	
Nodular sclerosis	61 (64.9)
Mixed cellularity	18 (19.2)
Lymphocyte-rich	6 (6.4)
Lymphocyte-depleted	2 (2.1)
Not classifiable	7 (7.4)
Stage	
I	6 (6.4)
II	51 (54.3)
III	18 (19.1)
IV	19 (20.2)
Presence of B symptoms	38 (40.4)
Presence of Bulky mass	21 (22.3)
Hemoglobin <105 g/L	19 (20.2)
Albumin <40g/L	54 (57.4)
White-cell count > 15,000/mm ³	13 (13.8)
Lymphocyte count <600/mm ³ or <8%	11 (11.7)
EBV	
Positive	28 (29.8)
Negative	49 (52.1)
Unknown	17 (18.1)
First-line treatment	
ABVD ¹	58 (61.7)
MOPPABV ²	27 (28.7)
MOPP ³	4 (4.3)
Other	5 (5.3)

¹Twenty patients received ABVD with radiation;

²Fourteen patients received MOPPABV with radiation;

³One patient received MOPP with radiation.

RNA from cHL cell lines was extracted using Trizol (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. RNA concentration was obtained using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Fisher Scientific, Madrid, Spain).

mRNA quantification

cDNA was synthesized from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) as per the manufacturer's protocol. TaqMan expression assays to determine mRNA levels of *PIWIL1* (Hs01041737_m1), *PIWIL2* (Hs00216263_m1) and *PIWIL4* (Hs00381509_m1) were supplied by Life Technologies. β -actin was used as housekeeping gene. RT-QPCR was performed in a total volume of 20 μ l in the ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Life Technologies). All samples for each gene were run in triplicate for 40 cycles using the following master mix and thermal cycler conditions: 10 μ l of the TaqMan universal PCR master mix, 1 μ l of the primers and probes, 2 μ l of the cDNA and 7 μ l of the RNase-free water; about 2 min 50 °C, 10 min 95 °C, 15 s 95 °C and 1 min 60 °C. Fluorescent emission data was captured, and mRNA concentrations were quantified by using the critical threshold value and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Western blot

Western Blot analysis was performed as previously described [48] using the following primary antibodies: PIWIL1 (ab85125; Abcam, Cambridge, UK), PIWIL2 (ab98852; Abcam) and PIWIL4 (ab111714; Abcam) and α -tubulin (A9044; Sigma).

Immunohistochemistry

Five- μ m-thick transverse sections of FFPE tissues were serially cut and mounted onto Dako Silanized Slides (Dako, Glostrup, Denmark). The immunohistochemical assay was performed as previously described [49] using rabbit polyclonal antibodies anti-human PIWIL1 (ab85125; Abcam), PIWIL2 (ab98852; Abcam) and PIWIL4 (NBP1-83491; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA).

piRNA expression analysis

To quantify piRNA expression, we made cDNA using miScript II RT Kit (Qiagen) as follows: 2 μ l of 5x miScript HiSpec Buffer, 1 μ l of 10x miScript Nucleics Mix, 1 μ l of miScript Reverse Transcriptase Mix and 250 ng of RNA in 6 μ l of distilled water. This was incubated for 1 hour at 37° and 5 minutes at 95°. The cDNA was then used for RT-QPCR quantification of piRNA expression using miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). For the RT-QPCR, the universal primer included in the kit was used together with the following primers: piR-651 (5'-AGAGAGGGGCCCCGTGCCTTG-3') [25], piR-20365 (5'-GGCCGTGATCGTATAGTGGTTAGT-3'), piR-20582 (5'-GGTGTAATGGTTAGCACTCTG-3'). RT-QPCR was performed on 7500 Real time PCR (Applied Biosystems). For each sample: 5 μ l of 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ l of 10x miScript Universal Primer, 1 μ l

of the specific primer (10nM), 2 μ l of distilled water and 1 μ l of our cDNA template. PCR conditions were: first 15 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15s at 94°C, 30s at 55°C and 34s at 70°C, and finally the dissociation curve analysis. RNU6B (Hs_RNU6-2_11, Qiagen miScript Primer Assays) was used as endogenous control.

PiRNA expression analysis in serum samples

Total RNA from serum samples was obtained as previously described [44] using miRNeasy Mini Kit (Qiagen). The quantification of piR-651 levels were performed using the same methodology than in lymph nodes (previous section) but for cDNA synthesis only 100ng of total RNA was used.

Chromogenic *in situ* hybridization

Custom miRCURY LNA Detection Probe (Exiqon A/S, Vedbaek, Denmark) 5' fluorescein labelled for piR-651 was used in FFPE tissue sections on Dako Silanized Slides (S-3003; Dako). Chromogenic *in situ* hybridization was performed manually. For dewaxing and antigen retrieval, the sections were manually immersed in Target Retrieval solution, high pH (Dako) and heated in a water bath at 95–99°C for 20 min (Dako PT Link). Slides were pretreated with protease 1 for 15 minutes at 37°C. A total amount of 70 μ l of 25-nM probe was hybridized in 1X sodium chloride–sodium citrate hybridization buffer (SSC) (Innogenetics, Antwerp, Belgium) up to 52°C for 2 hours. We used a prediluted mouse anti-FITC antibody (Leica Biosystems, Nußloch, Alemania) for 60 minutes. Immunoperoxidase staining was performed using Advance system/HRP (Dako) and Liquid DAB+ (Dako). Finally, sections were stained with hematoxylin.

Statistical analyses

We analyzed the association of piRNA expression with disease-free survival (DFS), overall survival (OS) and complete response (CR). DFS was measured from the time of occurrence of a disease-free state or attainment of a CR to disease recurrence or death as a result of lymphoma or acute toxicity of treatment. OS was calculated from the time of diagnosis to the date of death from any cause or last follow-up. Optimal cut-offs of piRNA expression data for DFS and OS were assessed by means of maximally selected log-rank statistics using the Maxstat package (R statistical package, v. 2.8.1, Vienna, Austria) [50]. MaxStat identified a significant cutoff only for piR-651 (cutoff=0.25; mean expression of low group: -0.046 [range: -0.37-0.18]; mean expression of high group: 1.27 [range: 0.26-6.11]).

DFS and OS were estimated with the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. A multivariate regression analysis assessing the significance of individual clinical factors included in the International Prognostic Score and significant piRNAs was performed by using the

Cox proportional hazards model with backward selection. The Chi-squared or Fisher's exact test was used to estimate differences in distributions. The multivariate analysis for treatment response was performed by using Binary Logistic regression. All statistical analyses were performed using PAS W Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL) and R v2.8.1. The level of significance was set at ≤ 0.05 . All performed tests were two-sided.

CONFLICTS OF INTEREST

All authors declare no conflicts of interest.

GRANT SUPPORT

This work was supported by grants from AECC-Catalunya 2013 (sponsored by Mat Holding) and SDCSD of University of Barcelona. A.C. and J.J.C. are APIF fellows of the University of Barcelona and M.D.B. is supported by ISCII (Rio Hortega CM13/00205).

REFERENCES

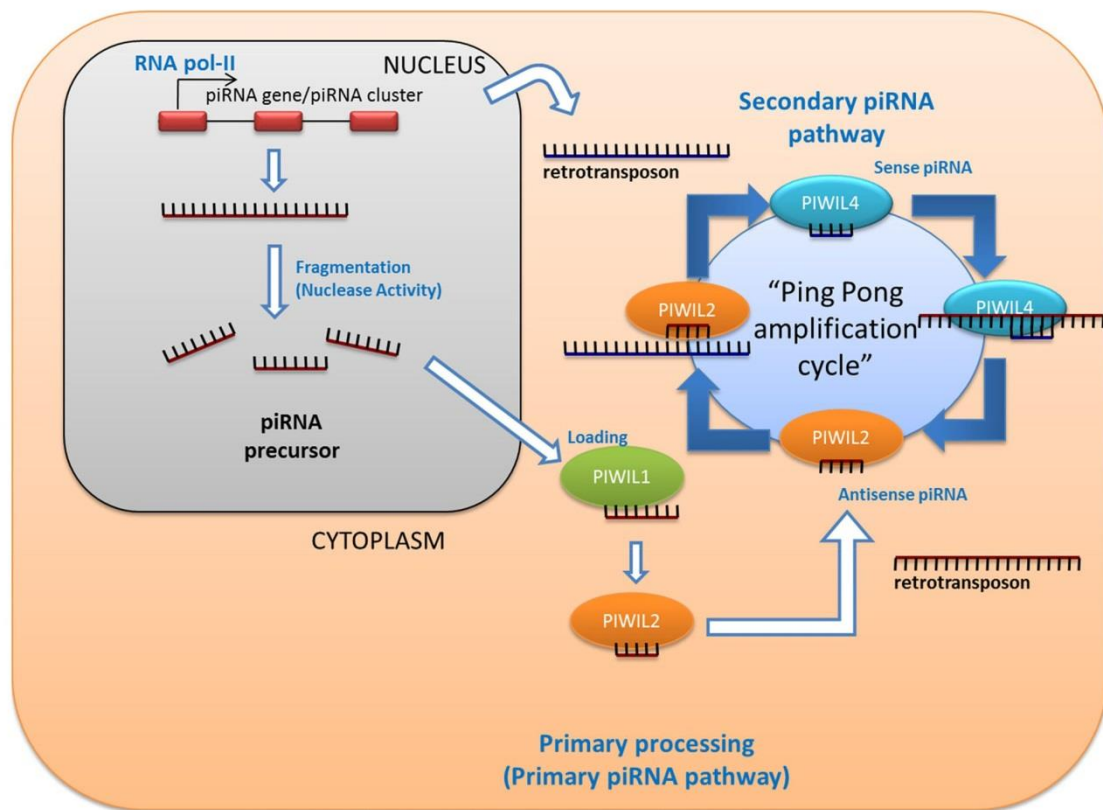
- Küppers R. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *ASH Education Program Book*. 2009; 2009:491-496.
- Greaves P, Clear A, Owen A, Iqbal S, Lee A, Matthews J, Wilson A, Calaminici M and Gribben JG. Defining characteristics of classical Hodgkin lymphoma microenvironment T-helper cells. *Blood*. 2013; 122:2856-2863.
- Hasenclever D, Diehl V, Armitage JO, Assouline D, Björkholm M, Brusamolino E, Canellos GP, Carde P, Crowther D and Cunningham D. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339:1506-1514.
- Connors JM. Risk assessment in the management of newly diagnosed classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2015; 125:1693-1702.
- Tiacci E, Döring C, Brune V, van Noesel CJ, Klapper W, Mechttersheimer G, Falini B, Küppers R and Hansmann M-L. Analyzing primary Hodgkin and Reed-Sternberg cells to capture the molecular and cellular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012; 120:4609-4620.
- Navarro A, Diaz T, Martinez A, Gaya A, Pons A, Gel B, Codony C, Ferrer G, Martinez C and Montserrat E. Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2009; 114:2945-2951.
- Navarro A, Gaya A, Martinez A, Urbano-Ispizua A, Pons A, Balagué O, Gel B, Abrisqueta P, Lopez-Guillermo A and Artells R. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2008; 111:2825-2832.
- Jones K, Nourse JP, Keane C, Bhatnagar A and Gandhi MK. Plasma microRNA are disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clinical Cancer Research*. 2014; 20:253-264.
- Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, Delaney A, Jones SJ, Iqbal J and Weisenburger DD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2010; 362:875-885.
- Steidl C, Connors JM and Gascoyne RD. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *Journal of Clinical Oncology*. 2011; 29:1812-1826.
- Hutvagner G and Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008; 9:22-32.
- Watanabe T, Takeda A, Tsukiyama T, Mise K, Okuno T, Sasaki H, Minami N and Imai H. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & development*. 2006; 20:1732-1743.
- Grivna ST, Beyret E, Wang Z and Lin H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes & development*. 2006; 20:1709-1714.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ and Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006; 442:199-202.
- Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, Morris P, Brownstein MJ, Kuramochi-Miyagawa S and Nakano T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 2006; 442:203-207.
- Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP and Kingston RE. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*. 2006; 313:363-367.
- Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degnan BM, Rokhsar DS and Bartel DP. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. 2008; 455:1193-1197.
- Lakshmi SS and Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic acids research*. 2008; 36:D173-D177.
- Deng W and Lin H. Miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Developmental cell*. 2002; 2:819-830.
- Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, Ikawa M, Iwai N, Okabe M and Deng W. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*. 2004; 131:839-849.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R and Hannon GJ. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007; 128:1089-1103.

22. Castel SE and Martienssen RA. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*. 2013; 14:100-112.
23. Watanabe T and Lin H. Posttranscriptional Regulation of Gene Expression by Piwi Proteins and piRNAs. *Molecular cell*. 2014; 56:18-27.
24. Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R, Frey S, Sander C, Tuschl T and Kandel ER. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell*. 2012; 149:693-707.
25. Cheng J, Guo J-M, Xiao B-X, Miao Y, Jiang Z, Zhou H and Li Q-N. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica Chimica Acta*. 2011; 412:1621-1625.
26. Huang G-I, Hu H, Xue X, Shen S, Gao E-I, Guo G, Shen X and Zhang X. Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2013; 15:563-568.
27. Law PT-Y, Qin H, Ching AK-K, Lai KP, Co NN, He M, Lung RW-M, Chan AW-H, Chan T-F and Wong N. Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2013; 58:1165-1173.
28. Yan H, Wu Q, Sun C, Ai L, Deng J, Zhang L, Chen L, Chu Z, Tang B and Wang K. piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2015; 29:196-206. doi: 10.1038/leu.2014.135.
29. Cheng J, Deng H, Xiao B, Zhou H, Zhou F, Shen Z and Guo J. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer letters*. 2012; 315:12-17.
30. Mei Y, Clark D and Mao L. Novel dimensions of piRNAs in cancer. *Cancer letters*. 2013; 336:46-52.
31. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2011; 12:861-874.
32. Ross RJ, Weiner MM and Lin H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature*. 2014; 505:353-359.
33. Ishizu H, Siomi H and Siomi MC. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes & development*. 2012; 26:2361-2373.
34. Suzuki R, Honda S and Kirino Y. PIWI expression and function in cancer. *Frontiers in genetics*. 2012; 3.
35. Luteijn MJ and Ketting RF. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nature Reviews Genetics*. 2013; 14:523-534.
36. Navarro A, Tejero R, Viñolas N, Cordeiro A, Marrades R, Fuster D, Caritg O, Moises J, Muñoz C and Molins L. The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015; 6:31544-56. doi: 10.18632/oncotarget.3003.
37. Zhao YM, Zhou JM, Wang LR, He HW, Wang XL, Tao ZH, Sun HC, Wu WZ, Fan J and Tang ZY. HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *Cancer*. 2012; 118:2708-2717.
38. Taubert H, Greither T, Kaushal D, Würfl P, Bache M, Bartel F, Kehlen A, Lautenschläger C, Harris L and Kraemer K. Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene*. 2007; 26:1098-1100.
39. Grochola L, Greither T, Taubert H, Möller P, Knippschild U, Udelnow A, Henne-Bruns D and Würfl P. The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *British journal of cancer*. 2008; 99:1083-1088.
40. Fujita K, Tsujimura A, Miyagawa Y, Kiuchi H, Matsuoka Y, Takao T, Takada S, Nonomura N and Okuyama A. Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer research*. 2006; 66:11166-11171.
41. Zhang H, Ren Y, Xu H, Pang D, Duan C and Liu C. The expression of stem cell protein Piwil2 and piR-932 in breast cancer. *Surgical oncology*. 2013; 22:217-223.
42. Cui L, Lou Y, Zhang X, Zhou H, Deng H, Song H, Yu X, Xiao B, Wang W and Guo J. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers. *Clinical biochemistry*. 2011; 44:1050-1057.
43. Lin Y, Gustafson MP, Bulur PA, Gastineau DA, Witzig TE and Dietz AB. Immunosuppressive CD14+ HLA-DRlow/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2011; 117:872-881.
44. Navarro A, Díaz T, Tovar N, Pedrosa F, Tejero R, Cibeira M, Magnano L, Rosiñol L, Monzó M and Bladé J. A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015; 6:1874-83. doi: 10.18632/oncotarget.2761.
45. Schotte D, Pieters R and Den Boer M. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. *Leukemia*. 2012; 26:1-12.
46. Li H and Yang BB. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013; 34:870-879.
47. Lu YL and Zhang K. Identification of piRNAs in HeLa cells by massive parallel sequencing. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*. 2010; 43:635-641.
48. Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, Artells R, Bellosillo B, Garcia-Garcia M, Serrano S and Martinez A. Lestaurtinib inhibition of the Jak/STAT signaling pathway in hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis. *PloS one*. 2011; 6:e18856.

49. Artells R, Navarro A, Diaz T and Monzó M. Ultrastructural and Immunohistochemical Analysis of Intestinal Myofibroblasts During the Early Organogenesis of the Human Small Intestine. *The Anatomical Record*. 2011; 294:462-471.
50. Hothorn T and Lausen B. On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Computational Statistics & Data Analysis*. 2003; 43:121-137

PiwiRNA-651 as marker of treatment response and survival in classical Hodgkin lymphoma

SUPPLEMENTARY FIGURE



Supplementary Figure S1: piRNA biogenesis pathway.

DISCUSSIÓ

4. Discussió

El LH és una neoplàsia d'origen B caracteritzada per contenir molt poques cèl·lules tumorals envoltades d'un microambient reactiu. Les cèl·lules tumorals són cèl·lules B del centre germinal que aconsegueixen evadir l'apoptosi. Els mecanismes epigenètics són crucials per la inactivació dels gens clau relacionals amb la supervivència de les cèl·lules HRS²⁹ i també s'han identificat patrons específics de miRNAs en les mostres de pacients de LH i de línies cel·lulars^{91,93,94,99}. En els últims anys s'ha revelat el paper dels ARNs no codificants petits en diversos processos cel·lulars, incloent el càncer. Els més estudiats són els miRNAs, que es coneixen des de fa més de 20 anys, que actuen com a reguladors post-transcripcionals. Tot i així, altres grups de ARNs no codificants petits, com els piRNAs, també es coneixen per prendre part en aquests processos, si bé no se'n coneixen tant detalladament les funcions. En el primer treball, hem estudiat com els miRNAs es poden regular pel mecanisme epigenètic de la metilació. En el segon treball, hem estudiat si la via PIWI/piRNA estava activa en el LHC i si alguns dels seus components podien ser d'utilitat com a marcador pronòstic.

Regulació epigenètica de l'expressió dels miRNAs en el limfoma de Hodgkin

El LH és una neoplàsia atípica caracteritzada pel rescat de les cèl·lules B apoptòtiques del centre germinal després de la reordenació dels gens de les immunoglobulines. Els mecanismes epigenètics són crucials per la inactivació dels gens clau relacionals amb la supervivència de les cèl·lules HRS²⁹ i també s'han identificat patrons específics de miRNAs en les mostres de pacients de LH i de línies cel·lulars^{91,93,94,99}. En el present estudi hem analitzat la influència de la metilació en el silenciament dels miRNAs supressors de tumors en línies cel·lulars d'HL. Degut al baix nombre de cèl·lules tumorals en les biòpsies primàries (<1%), els nostres anàlisis s'han centrat en les línies cel·lulars de LH, àmpliament utilitzades per al seu estudi. Hem observat canvis en els nivells d'expressió de diversos miRNAs després del tractament amb l'agent desmetilant 5-Aza-dC, i hem identificat un grup de 13 miRNAs que eren reexpressats en les dues línies cel·lulars d'estudi, la L-428 i la L-1236. En la fase de perfil, hem observat un solapament relativament baix entre les dues línies cel·lulars. Això pot ser explicat en part per les diferències de l'origen de les línies cel·lulars. La L-428 es deriva d'un pacient amb EN mentre que la L-1236, deriva d'un pacient amb CM. En estudis anteriors del nostre grup, ja s'havien observat diferències entre els patrons d'expressió dels miRNAs de ganglis limfàtics de pacients entre EN i CM, fet

que es podia emprar per discriminar entre els dos grups de pacients en l'anàlisi supervisat i en el no-supervisat⁹¹. Per validar els 13 miRNAs, hem realitzat una MSP i hem comparat les línies cel·lulars de LH amb cèl·lules B normals de sang perifèrica. Una limitació d'aquest estudi és que el teixit normal ideal per realitzar aquesta comparació haguessin estat cèl·lules B de centre germinal en lloc de les de sang perifèrica; tot i així, no les teníem disponibles. Després d'aquest anàlisi, hem identificat diversos miRNAs metilats, incloent el miR-34a i el miR-203, que han estat descrits prèviament com a gens supressors de tumors que són silenciats per metilació en diverses neoplàsies, incloent alguns limfomes^{171,172,79,173-175}. S'ha vist que el miR-375 i el miR-342 estan infraexpressats per metilació en càncer de mama¹⁷⁶ i en càncer colorrectal¹⁷⁷, respectivament, però per al nostre coneixement és la primera vegada que el miR-490 s'ha detectat metilat en tumors, encara que s'hagi observat infraexpressat en càncer colorrectal¹⁷⁸. A més, el clúster MIR512-525, que està hipermetilat en la majoria de les línies cel·lulars i hipometilat en la placenta i en alguns teixits embrionaris¹⁷⁹, estava metilat tant en les línies cel·lulars com en el *pool* de cèl·lules B normals en el present estudi, reprimint l'expressió de tots els miRNAs continguts en el clúster. Una possible limitació d'aquest experiment és que no totes les parelles de primers utilitzades en l'estudi tenen la mateixa eficiència en la PCR, ja que algunes d'elles mostren bandes dèbils que poden indicar una reacció inespecífica o que hi hagi metilació parcial. El 5-Aza-dC, sota en nom comercial de decitabina (DAC), s'utilitza en la clínica per al tractament de síndromes mielodisplàsics i de la leucèmia mieloide aguda. El 5-Aza-dC és un agent hipometilant amb un mecanisme d'acció dual dosi-dependent, inhibició de la proliferació a dosis elevades i hipometilació del DNA i reexpressió gènica a dosis baixes, que afecta a la diferenciació cel·lular, la supressió tumoral i a l'estimulació dels mecanismes immunitaris¹⁸⁰. En aquest estudi, en el qual hem fet servir concentracions de 5-Aza-dC que incloïen les màximes concentracions assolides en plasma pels pacients en les dosis clíniques (C_{max} 0.3-1.6 μ M), hem observat un efecte antiproliferatiu dosidependent a les 72 hores en totes les línies cel·lulars de LH. La modesta reducció de la proliferació observada amb el tractament amb 5-Aza-dC en aquest estudi pot ser deguda al poc temps d'exposició, ja que els efectes citotòxics mediat per el 5-Aza-dC estan relacionats majoritàriament per la seva capacitat d'intercalar-se a l'ADN i afecten només a les cèl·lules que s'estan dividint¹⁸¹. A més a més, els dos miRNAs supressors de tumors, el miR-34a i el miR-203, eren reexpressats a dosis baixes o intermèdies de 5-Aza-dC, cosa que ens porta a especular que en la pràctica clínica, les dosis baixes o intermèdies poden produir efectes antitumorals més prolongats.

El miR-203 està hipermetilat en múltiples neoplàsies hematològiques^{172,175,182} però no en les cèl·lules sanguínies de gent sana o en les cèl·lules de moll d'os¹⁷⁵. El miR-203 s'ha relacionat amb diversos gens diana, incloent *ABL1*¹⁷², *CREB1*¹⁷⁴ i *SOCS3*¹⁸³. Per al nostre coneixement, aquest és el primer estudi que avalua el miR-203 en LH. En un estudi previ en línies cel·lulars de LH¹⁷⁵, la metilació del miR-203 es va associar amb la del miR-34a. En aquest estudi, aquesta associació només és manté certa per les línies L-428 i L-1236, però no per la HD-MY-Z i la L-540, on només el miR-203, però no el miR-34a, estava metilat. Com el miR-34a, el miR-203 es reexpresava a dosis baixes i intermèdies de 5-Aza-dC. En la línia cel·lular de limfoma JEKO-1, la reexpressió del miR-203 condueix a la inhibició de la proliferació cel·lular i a l'augment de la mort cel·lular¹⁸⁴. La reexpressió gènica produïda per agents desmetilants com el 5-Aza-dC no és aleatòria i pot ser reproduïble¹⁸⁵, fet de màxima importància per trobar una dosi que pugui produir un efecte citotòxic ràpid i que alhora pugui estimular la reexpressió dels supressors de tumors miR-34a i miR-203.

En resum, hem demostrat que el LH conté un patró de metilació específic de miRNAs, que inclou els supressors de tumors miR-34a i miR-203, que es pot revertir amb un tractament amb 5-Aza-dC. A més, la reexpressió d'aquests dos miRNAs a dosis baixes o intermèdies de 5-Aza-dC mereix ser aprofundida, incloent la quantificació del grau de metilació d'aquests miRNAs en mostres de pacients, per tal de determinar l'aplicabilitat de les nostres troballes.

El piwiRNA-651 com a marcador de resposta a tractament i supervivència en Limfoma de Hodgkin

Els ARNs no codificants petits han emergit com a importants reguladors post-transcripcionals, sobretot els siRNAs i els microRNAs¹⁸⁶. Els piRNAs, no s'havien estudiat gaire fins al moment degut que es creia que eren específics de les cèl·lules germinals i durant les primeres fases del desenvolupament embrionari i que eren silenciats en els teixits diferenciats¹²¹. Recentment, s'ha detectat l'expressió de piRNAs en cèl·lules somàtiques i en cèl·lules tumorals^{161,162,187}. En el segon estudi, hem investigat si la via PIWI/piRNA pot estar involucrada en la carcinogènesi del LHc.

En primer lloc hem estudiat les proteïnes *PIWIL1*, *PIWIL2* i *PIWIL4*, que s'uneixen específicament als piRNAs i que participen en la seva biogènesi¹⁸⁸. Observem que aquestes presenten dos patrons d'expressió diferents. *PIWIL1* s'expressa a nivells

molt baixos en comparació a PIWIL2 i PIWIL4, i només s'expressa de forma significativa en una de les quatre línies cel·lulars. En canvi, PIWIL2 i PIWIL4 s'expressen en totes les línies cel·lulars de forma significativa. Aquestes diferències poden ser degudes a la participació en les diferents vies de la biogènesi dels piRNAs¹¹⁸. *PIWIL1* actua de forma exclusiva durant la biogènesi primària, *PIWIL4* només a la secundària o del "ping-pong" i *PIWIL2* en ambdues. Les diferències entre l'expressió de PIWIL1 en les línies cel·lulars poden indicar que a via primària no està sempre activa. Aquesta s'encarrega de generar noves seqüències de piRNAs, mentre que la secundària ajuda a mantenir el *pool* de piRNAs de la cèl·lula¹¹⁸. Curiosament, en diversos tumors sòlids, la reactivació de PIWIL1, associada amb un pitjor pronòstic, podria estar relacionada amb un fenotip de cèl·lula mare^{131,139,144,145}. De forma similar, PIWIL1 s'expressa en les cèl·lules mare hematopoètiques CD34+¹⁸⁹. Quan vam estudiar l'expressió de les proteïnes PIWI en ganglis limfàtics de pacients, vam observar un patró similar al de les línies cel·lulars. PiwiL1 només era detectat al citoplasma d'algunes cèl·lules tumorals, mentre que PiwiL2 i PiwiL4 es detectaven en la majoria dels casos estudiats. A més a més, l'expressió de PiwiL2 no era exclusiva de les cèl·lules HRS si no que també es detectava en les cèl·lules del microambient, indicant que la via secundària no és exclusiva de les cèl·lules tumorals. En la mateixa línia, l'expressió de PiwiL2 i PiwiL4 s'ha detectat en altres tumors i en els seus teixits normals control.^{139,149}

Per explorar més a fons l'activitat de la via PIWI/piRNA en el LHC, hem investigat si tres piRNAs (piR-651, piR-20365 i piR-20582) prèviament descrits sobreexpressats en tumors sòlids^{160,162}, podien estar-ho en LHC. Els tres piRNAs es van detectar en totes les mostres, incloent ganglis limfàtics de pacients, ganglis reactius utilitzats com a controls i en quatre línies cel·lulars. La detecció dels tres piRNAs en les mostres control suggereix un manteniment d'un *pool* als teixits somàtics^{121,122}, incloent ens ganglis limfàtics. De fet, l'estudi per hibridació *in situ* del piR-651 mostra que no només s'expressa en les cèl·lules HRS sinó també en els fol·licles normals, especialment als centroblasts. Curiosament, l'expressió del piR-651 en els ganglis limfàtics dels pacients era significativament més alta que la dels ganglis reactius, suggerint que aquest increment pot ser degut a la presència de la població de les cèl·lules HRS, que expressen el piR-651 i alhora produeixen canvis en les cèl·lules del voltant que condueixen en un increment global dels nivells de piR-651 en el gangli de LHC. Com ja s'havia descrit en altres tumors^{160,162}, els tres piRNAs estan sobreexpressats en les mostres tumorals. Quan vam estudiar la correlació de l'expressió d'aquests tres piRNAs en les mostres de pacients amb el seu pronòstic, el piR-651 emergia com un marcador

pronòstic independent per SLM i SG. Els pacients amb nivells baixos de piR-651 tenien pitjor pronòstic. Cal remarcar que, els pacients que no van assolir resposta completa, tenien nivells més baixos de piR-651. En la mateixa línia, l'anàlisi del piR-651 en mostres de sèrum va mostrar que els nivells de piR-651 estaven infraexpressats en el moment del diagnòstic però quan el pacient assolia la resposta completa, incrementaven. Cui i cols. mostren que el piR-651 quan s'estudia en mostres de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica de pacients de càncer gàstric, també era menor en comparació a les mostres controls¹⁸⁷. Això ens porta a especular que l'expressió del piR-651 en sèrum podria venir de les cèl·lules circulants més que de les tumorals, i la infraexpressió observada en els pacients podria reflectir diferències entre les diferents poblacions de cèl·lules sanguínies associades a la presència del limfoma¹⁹⁰. S'han trobat resultats similars en altres estudis quan s'estudiava l'expressió de miRNAs en altres tumors, incloent mieloma múltiple, on diversos miRNAs estaven infraexpressats en sèrum al diagnòstic però es sobreexpressaven a la resposta completa, i nivells baixos en sèrum estaven associats a una supervivència lliure de progressió més curta¹⁹¹. En LHC, només un estudi anterior havia estudiat els miRNAs en mostres de plasma, i els autors van identificar diversos miRNAs, incloent el miR-494 i el miR-1973, els nivells dels quals estaven sobreexpressats al diagnòstic i infraexpressats a la resposta completa⁹². Aquests resultats, en la mateixa línia que els nostres, indiquen que l'anàlisi dels ARNs no-codificants petits en mostres de sèrum i plasma pot ser útil per monitoritzar la resposta al tractament.

Al contrari que en els nostres resultats, el piR-651 va ser identificat com un oncogen en càncer gàstric, on Cheng i cols. van demostrar *in vitro* que la seva inhibició s'associava en una reducció del creixement cel·lular degut a una parada en la fase G2/M de les línies cel·lulars de càncer gàstric¹⁶². En canvi, encara que nosaltres també haguem observant sobreexpressió del piR-651 en les mostres de pacient, els nivells baixos de piR-651 s'associaven a una pitjor supervivència. S'ha demostrat prèviament que altres ARNs no codificants petits, com els miRNAs, poden jugar un paper dual com a oncogen o com a supressor de tumors depenent del context cel·lular¹⁹². S'ha vist que el tractament pot induir canvis en el context cel·lular afectant la funció d'alguns miRNAs, que es converteixen en oncogens o en supressors de tumors quan el tractament administrat és depenent de diana¹⁹³. Com els miRNAs, els piRNAs estan implicats en la regulació post-transcripcional mitjançant un mecanisme similar basat en l'aparellament de seqüències complementàries, que porta a una repressió traduccional¹⁹⁴. Fins a dia d'avui, pocs

estudis han associat piRNAs i càncer, molts dels quals estan sobreexpressats i actuen com a oncogens^{149,160–162,166,168}. Tot i així, els piRNAs també poden jugar un paper dual dependent del tumor. Per exemple, el piR-823 actua com a gen supressor de tumors en càncer gàstric¹⁶⁰ i com a oncògen en mieloma múltiple¹⁶⁷.

CONCLUSIONS

5.Conclusions

Regulació epigenètica de l'expressió dels miRNAs en el limfoma de Hodgkin

1. El tractament amb l'agent desmetilant 5-Aza-dC provoca la reexpressió de miRNAs silenciats en les línies cel·lulars L-428 i L-1236 de LHc.
2. L'estudi del patró de metilació dels miRNAs identificats com a reexpressats després del tractament amb 5-Aza-dC ens ha permès identificar tres situacions diferents:
 - a. MiRNAs bàsicament metilats en les línies de LHc però desmetilats en les cèl·lules B de sang perifèrica control: *MIR34A*, *MIR203*, *MIR490* i *MIR375*.
 - a. MiRNAs que presenten una metilació parcial tant en les línies de LHc com en les cèl·lules B de sang perifèrica control: *MIR512-525*
 - b. MiRNAs dels quals la metilació és dependent de la línia cel·lular estudiada: *MIR342*.
3. En els ganglis de pacients, els gens *MIR34A* i el *MIR203*, coneguts supressors tumorals, es troben metilats de forma predominant en les cèl·lules HRS i desmetilats en les cèl·lules del microambient.
4. El tractament *in vitro* amb 5-Aza-dC inhibeix la proliferació de forma moderada a dosis elevades, però també indueix la reexpressió del miR-34a i del miR-203 a dosis baixes o moderades.

El piwiRNA-651 com a marcador de resposta a tractament i supervivència en Limfoma de Hodgkin

1. La via PIWI/piRNA està activa en el LHc, com s'evidencia per l'expressió, tant en línies cel·lulars de LHc com en ganglis de pacients, de les proteïnes PIWIL1, PIWIL2 i PIWIL4 i dels piRNAs piR-651, piR-20365 i piR-20582.

2. PIWIL1 s'expressa a nivells baixos en comparació amb PIWIL2 i PIWIL4 en les línies cel·lulars de LHc, però no s'expressa en les cèl·lules B de sang perifèrica control.
3. PIWIL2 i PIWIL4 s'expressen tant en les línies cel·lulars com en les cèl·lules B de sang perifèrica controls, però aquestes proteïnes estan infraexpressades respecte a les cèl·lules B de sang perifèrica controls.
4. En ganglis de pacients, PIWIL1 s'expressa en el 33.3% de les mostres; PIWIL2, en el 100%; i PIWIL4, en el 73.3%. En tots els casos es tracta d'una expressió citoplasmàtica en les cèl·lules HRS. En el cas de PIWIL2, també és podem observar expressió en la majoria de les cèl·lules del microambient reactiu.
5. El piR-651, piR-20365 i piR-20582 s'expressen en els ganglis de pacients, en els ganglis reactius control i en totes les línies cel·lulars estudiades. Tots tres piRNAs estan sobreexpressats en els ganglis de pacients respecte els ganglis controls.
6. En LHc els nivells de piR-651 en mostres de ganglis de pacients de LHc tenen un impacte en el pronòstic i en la resposta al tractament de primera línia.
7. L'expressió del piR-651 pot ser detectada en sèrum i els seus nivells modulen al llarg del tractament.
8. L'anàlisi mitjançant hibridació *in situ* en mostres de ganglis de pacients de LHc i de ganglis reactius control permeten comprovar que el piR-651 s'expressa i de forma elevada en el citoplasma de les cèl·lules HRS.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

1. Hodgkin. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med. Chir. Trans.* **17**, 68–114 (1832).
2. Wilks, S. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease). *Guy's Hosp Rep* 56–67 (1865).
3. The International Agency for Research on Cancer. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue (IARC WHO Classification of Tumours)*. World Health Organization (2008).
4. Reed, D. On the pathological changes in Hodgkin's disease, with especial reference to its relation to tuberculosis. *Johns Hopkins Hosp Rep* (1902).
5. Sternberg, C. Über eine Eigenartige unter den Bilde der Pseudolaukamis verlaufande Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Z. Heilkd.* (1898).
6. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **66**, 7–30 (2015).
7. Vockerodt, M. *et al.* The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J. Pathol.* **235**, 312–22 (2015).
8. Rowlings, P. A. *et al.* Increased incidence of Hodgkin's disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Clin. Oncol.* **17**, 3122–7 (1999).
9. Dolcetti, R., Boiocchi, M., Gloghini, A. & Carbone, A. Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *Eur. J. Cancer* **37**, 1276–87 (2001).
10. Harris, N. L. *et al.* A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* **84**, 1361–92 (1994).
11. Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M.-L. & Küppers, R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu. Rev. Pathol.* **4**, 151–74 (2009).
12. DeVita, V. T. J., Lawrence, T. S. & Rosenberg, S. A. *DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (2011).
13. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 172–184 (2015).
14. Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M. L. & Rajewsky, K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J. Exp. Med.* **184**, 1495–505 (1996).
15. Küppers, R. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 15–27 (2009).

16. Küppers, R. *et al.* Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 10962–6 (1994).
17. Klein, U. *et al.* Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol. Rev.* **162**, 261–80 (1998).
18. Irsch, J. *et al.* Class switch recombination was specifically targeted to immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's disease-derived cell lines. *Br. J. Haematol.* **113**, 785–93 (2001).
19. Martín-Subero, J. I. *et al.* Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* **66**, 10332–8 (2006).
20. Bräuninger, A. *et al.* Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1239–47 (1999).
21. Marafioti, T. *et al.* Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J. Clin. Oncol.* **17**, 3804–9 (1999).
22. Rengstl, B. *et al.* Incomplete cytokinesis and re-fusion of small mononucleated Hodgkin cells lead to giant multinucleated Reed-Sternberg cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20729–34 (2013).
23. Rengstl, B., Rieger, M. A. & Newrzela, S. On the origin of giant cells in Hodgkin lymphoma. *Commun. Integr. Biol.* **7**, e28602 (2014).
24. Brasier, A. R. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc. Toxicol.* **6**, 111–30 (2006).
25. Moynagh, P. N. The NF-kappaB pathway. *J. Cell Sci.* **118**, 4589–92 (2005).
26. Aaronson, D. S. *et al.* A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653–5 (2002).
27. Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* **32**, 2601–13 (2013).
28. Watanabe *et al.* Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology* **36**, 353–361 (2000).
29. Ushmorov, A. *et al.* Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **107**, 2493–500 (2006).
30. Hoppe, R. T., Mauch, P. T., Armitage, J. O., Diehl, V. & Weiss, L. M. *Hodgkin Lymphoma*. Lippincott Williams & Wilkins (2007).
31. Fromm, J. R., Thomas, A. & Wood, B. L. Flow cytometry can diagnose classical Hodgkin

- Lymphoma in lymph nodes with high sensitivity and specificity. *Am. J. Clin. Pathol.* **131**, 322–32 (2009).
32. Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R. & Carbone, A. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. *J. Pathol.* **221**, 248–263 (2010).
 33. Aldinucci, D., Celegato, M. & Casagrande, N. Microenvironmental interactions in classical Hodgkin lymphoma and their role in promoting tumor growth, immune escape and drug resistance. *Cancer Lett.* (2015).
 34. Schreck, S. *et al.* Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. *Hematol. Oncol.* **27**, 31–9 (2009).
 35. Poppema, S., Potters, M., Visser, L. & van den Berg, A. M. Immune escape mechanisms in Hodgkin's disease. *Ann. Oncol.* **9 Suppl 5**, S21-4 (1998).
 36. Fromm, J. R., Kussick, S. J. & Wood, B. L. Identification and purification of classical Hodgkin cells from lymph nodes by flow cytometry and flow cytometric cell sorting. *Am. J. Clin. Pathol.* **126**, 764–80 (2006).
 37. Skinnider, B. F. & Mak, T. W. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**, (2002).
 38. Yamamoto, R. *et al.* PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* **111**, 3220–4 (2008).
 39. Steidl, C., Connors, J. M. & Gascoyne, R. D. Molecular pathogenesis of Hodgkin's lymphoma: increasing evidence of the importance of the microenvironment. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1812–26 (2011).
 40. Roemer, M. G. M. *et al.* PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2690–2697 (2016).
 41. Marshall, N. A. *et al.* The relationships between Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and regulatory T cells in Hodgkin's lymphoma. *Exp. Hematol.* **35**, 596–604 (2007).
 42. Maggio, E. *et al.* Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann. Oncol.* **13 Suppl 1**, 52–6 (2002).
 43. Baumforth, K. R. N. *et al.* Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am. J. Pathol.* **173**, 195–204 (2008).
 44. Steidl, C. *et al.* Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **362**, 875–85 (2010).
 45. Carbone, P. P., Kaplan, H. S., Musshoff, K., Smithers, D. W. & Tubiana, M. Report of the

- Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* **31**, 1860–1 (1971).
46. Crowther, D. & Lister, T. A. The Cotswolds report on the investigation and staging of Hodgkin's disease. *Br. J. Cancer* **62**, 551–2 (1990).
 47. Sanz, M. A. & Carreras, E. *Manual Práctico de Hematología Clínica*. 5ª edición. Escofet-Zamora (2008).
 48. Hasenclever, D. *et al.* A Prognostic Score for Advanced Hodgkin's Disease. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1506–1514 (1998).
 49. Straus, D. J. Long-term survivorship at a price: late-term, therapy-associated toxicities in the adult hodgkin lymphoma patient. *Ther. Adv. Hematol.* **2**, 111–9 (2011).
 50. Engert, A. & Raemaekers, J. Treatment of early-stage Hodgkin lymphoma. *Semin. Hematol.* **53**, 165–70 (2016).
 51. Vassilakopoulos, T. P. & Johnson, P. W. M. Treatment of advanced-stage Hodgkin lymphoma. *Semin. Hematol.* **53**, 171–9 (2016).
 52. Fedele, R. *et al.* Clinical Options in Relapsed or Refractory Hodgkin Lymphoma: An Updated Review. *J. Immunol. Res.* **2015**, 968212 (2015).
 53. CRICK, F. H. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**, 138–63 (1958).
 54. Crick, F. Central dogma of molecular biology. *Nature* **227**, 561–3 (1970).
 55. Mani, S. R. & Juliano, C. E. Untangling the web: the diverse functions of the PIWI/piRNA pathway. *Mol. Reprod. Dev.* **80**, 632–64 (2013).
 56. Yigit, E. *et al.* Analysis of the C. elegans Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. *Cell* **127**, 747–757 (2006).
 57. Azlan, A., Dzaki, N. & Azzam, G. Argonaute: The executor of small RNA function. *J. Genet. Genomics* (2016).
 58. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
 59. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* **75**, 855–862 (1993).
 60. Lelandais-Brière, C. *et al.* Small RNA diversity in plants and its impact in development. *Curr. Genomics* **11**, 14–23 (2010).
 61. Pfeffer, S. *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**, 734–6 (2004).
 62. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).
 63. Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Vertebrate microRNA genes. *Science* **299**, 1540 (2003).

64. Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–269 (2006).
65. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42**, D68–D73 (2014).
66. Redfern, A. D. *et al.* RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 6536–41 (2013).
67. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
68. Iwakawa, H. *et al.* The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* **25**, 651–665 (2015).
69. Vasudevan, S. & Steitz, J. A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**, 1105–18 (2007).
70. Eiring, A. M. *et al.* miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* **140**, 652–65 (2010).
71. Almeida, M. I., Reis, R. M. & Calin, G. A. Decoy activity through microRNAs: the therapeutic implications. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**, 1153–9 (2012).
72. Gonzalez, S., Pisano, D. G. & Serrano, M. Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle* **7**, 2601–8 (2008).
73. Kim, D. H., Saetrom, P., Snøve, O. & Rossi, J. J. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 16230–5 (2008).
74. Khraiwesh, B. *et al.* Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell* **140**, 111–22 (2010).
75. Croce, C. M. Oncogenes and Cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 502–511 (2008).
76. Croce, C. M. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 704–14 (2009).
77. Saxonov, S., Berg, P. & Brutlag, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 1412–7 (2006).
78. Hernando-Herraez, I., Garcia-Perez, R., Sharp, A. J. & Marques-Bonet, T. DNA Methylation: Insights into Human Evolution. *PLoS Genet.* **11**, e1005661 (2015).
79. Lodygin, D. *et al.* Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* **7**, 2591–600 (2008).
80. Bueno, M. J. *et al.* Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* **13**, 496–506 (2008).

81. Iorio, M. V, Piovano, C. & Croce, C. M. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 694–701 (2010).
82. Kim, J. K., Samaranyake, M. & Pradhan, S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 596–612 (2009).
83. Fabbri, M. *et al.* MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 15805–10 (2007).
84. Piletič, K. & Kunej, T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. *Arch. Toxicol.* 1–15 (2016).
85. Tang, R. *et al.* Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell Res.* **22**, 504–15 (2012).
86. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–9 (2002).
87. Svoronos, A. A. *et al.* OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res.* **76**, 3666–70 (2016).
88. Kluiver, J. *et al.* BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J. Pathol.* **207**, 243–9 (2005).
89. van den Berg, A. *et al.* High expression of B-cell receptor inducible gene BIC in all subtypes of Hodgkin lymphoma. *Genes. Chromosomes Cancer* **37**, 20–8 (2003).
90. Eis, P. S. *et al.* Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3627–32 (2005).
91. Navarro, A. *et al.* MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **111**, 2825–32 (2008).
92. Jones, K., Nourse, J. P., Keane, C., Bhatnagar, A. & Gandhi, M. K. Plasma microRNA are disease response biomarkers in classical Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res.* **20**, 253–64 (2014).
93. Van Vlierberghe, P. *et al.* Comparison of miRNA profiles of microdissected Hodgkin/Reed-Sternberg cells and Hodgkin cell lines versus CD77+ B-cells reveals a distinct subset of differentially expressed miRNAs. *Br. J. Haematol.* **147**, 686–90 (2009).
94. Gibcus, J. H. *et al.* Hodgkin lymphoma cell lines are characterized by a specific miRNA expression profile. *Neoplasia* **11**, 167–76 (2009).
95. Sánchez-Espiridión, B. *et al.* MicroRNA signatures and treatment response in patients with advanced classical Hodgkin lymphoma. *Br. J. Haematol.* **162**, 336–47 (2013).

96. Paydas, S. *et al.* Micro-RNA (miRNA) profile in Hodgkin lymphoma: association between clinical and pathological variables. *Med. Oncol.* **33**, 34 (2016).
97. Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 2257–61 (2006).
98. Medina, P. P., Nolde, M. & Slack, F. J. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* **467**, 86–90 (2010).
99. Navarro, A. *et al.* Regulation of JAK2 by miR-135a: prognostic impact in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* **114**, 2945–2951 (2009).
100. Van Den Berg, A. V., Magalhães, L. & Ferreira Vidal, A. MicroRNAs as Biomarkers of the Response to Treatment with ABVD Scheme in Hodgkin Lymphoma. *J. Leuk.* **3**, (2015).
101. Slezak-Prochazka, I. *et al.* Inhibition of the miR-155 target NIAM phenocopies the growth promoting effect of miR-155 in B-cell lymphoma. *Oncotarget* **5**, (2015).
102. Nie, K. *et al.* MicroRNA-mediated down-regulation of PRDM1/Blimp-1 in Hodgkin/Reed-Sternberg cells: a potential pathogenetic lesion in Hodgkin lymphomas. *Am. J. Pathol.* **173**, 242–52 (2008).
103. Leucci, E. *et al.* Inhibition of miR-9 de-represses HuR and DICER1 and impairs Hodgkin lymphoma tumour outgrowth in vivo. *Oncogene* **31**, 5081–9 (2012).
104. Tan, L. P. *et al.* A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, e137 (2009).
105. Ivanovska, I. *et al.* MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2167–74 (2008).
106. Ben Dhiab, M. *et al.* Investigation of miR9-1, miR9-2 and miR9-3 Methylation in Hodgkin Lymphoma. *Pathobiology* **82**, 195–202 (2015).
107. Lujambio, A. *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 1424–9 (2007).
108. Ben Dhiab, M. *et al.* Methylation of miR124a-1, miR124a-2, and miR124a-3 in Hodgkin lymphoma. *Tumour Biol.* **36**, 1963–71 (2015).
109. Aravin, A. *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203–7 (2006).
110. Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J. & Carmell, M. A. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **442**, 199–202 (2006).
111. Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z. & Lin, H. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* **20**, 1709–14 (2006).
112. Lau, N. C. *et al.* Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* **313**, 363–7 (2006).

113. Watanabe, T. *et al.* Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.* **20**, 1732–43 (2006).
114. Ku, H.-Y. & Lin, H. PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. *Natl. Sci. Rev.* **1**, 205–218 (2014).
115. Lakshmi, S. S. & Agrawal, S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res.* D173–D177 (2008).
116. Cox, D. N. *et al.* A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev.* **12 (23)**, 3715–27 (1998).
117. Bamezai, S., Rawat, V. P. S. & Buske, C. Concise review: The Piwi-piRNA Axis: Pivotal beyond transposon silencing. *Stem Cells* **30**, 2603–2611 (2012).
118. Luteijn, M. J. & Ketting, R. F. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 523–534 (2013).
119. Zheng, K. *et al.* Blockade of Pachytene piRNA Biogenesis Reveals a Novel Requirement for Maintaining Post-Meiotic Germline Genome Integrity. *PLoS Genet.* **8**, e1003038 (2012).
120. Meikar, O., Da Ros, M., Korhonen, H. & Kotaja, N. Chromatoid body and small RNAs in male germ cells. *Reproduction* **142**, 195–209 (2011).
121. Ross, R. J., Weiner, M. M. & Lin, H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature* **505**, 353–9 (2014).
122. Ishizu, H., Siomi, H. & Siomi, M. C. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev.* **26**, 2361–73 (2012).
123. Roovers, E. F. *et al.* Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. *Cell Rep.* **10**, 2069–82 (2015).
124. McClINTOCK, B. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **36**, 344–55 (1950).
125. Gregory, T. R. Synergy between sequence and size in Large-scale genomics. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 699–708 (2005).
126. Tan, Y. *et al.* Emerging roles for PIWI proteins in cancer. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **47**, 315–24 (2015).
127. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).

128. Qiao, D., Zeeman, A.-M., Deng, W., Looijenga, L. H. J. & Lin, H. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* **21**, 3988–99 (2002).
129. Liu, X. *et al.* Expression of hiwi gene in human gastric cancer was associated with proliferation of cancer cells. *Int. J. cancer* **118**, 1922–9 (2006).
130. Wang, Y. *et al.* The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **5**, 315–25 (2012).
131. Zhao, Y.-M. *et al.* HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *Cancer* **118**, 2708–2717 (2012).
132. Xie, Y. *et al.* Hiwi downregulation, mediated by shRNA, reduces the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Med. Rep.* **11**, 1455–61 (2015).
133. Siddiqi, S., Terry, M. & Matushansky, I. Hiwi mediated tumorigenesis is associated with DNA hypermethylation. *PLoS One* **7**, e33711 (2012).
134. Liu, W.-K., Jiang, X.-Y. & Zhang, Z.-X. Expression of PSCA, PIWIL1, and TBX2 in endometrial adenocarcinoma. *Onkologie* **33**, 241–5 (2010).
135. Wang, D.-W., Wang, Z.-H., Wang, L.-L., Song, Y. & Zhang, G.-Z. Overexpression of hiwi promotes growth of human breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 7553–8 (2014).
136. Wang, X. *et al.* Silencing HIWI suppresses the growth, invasion and migration of glioma cells. *Int. J. Oncol.* **45**, 2385–92 (2014).
137. Sun, G. *et al.* Clinical significance of Hiwi gene expression in gliomas. *Brain Res.* **1373**, 183–188 (2011).
138. Lim, S. L. *et al.* Overexpression of piRNA pathway genes in epithelial ovarian cancer. *PLoS One* **9**, e99687 (2014).
139. Navarro, A. *et al.* The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer. *Oncotarget* (2015).
140. Li, L., Yu, C., Gao, H. & Li, Y. Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC Cancer* **10**, 38 (2010).
141. Liu, C. *et al.* Combined phenotype of 4 markers improves prognostic value of patients with colon cancer. *Am. J. Med. Sci.* **343**, 295–302 (2012).
142. Zeng, Y. *et al.* HIWI expression profile in cancer cells and its prognostic value for patients with colorectal cancer. *Chin. Med. J. (Engl.)* **124**, 2144–9 (2011).
143. He, W. *et al.* Expression of HIWI in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *BMC Cancer* **9**, 426 (2009).

144. Grochola, L. F. *et al.* The stem cell-associated Hiwi gene in human adenocarcinoma of the pancreas: expression and risk of tumour-related death. *Br. J. Cancer* **99**, 1083–8 (2008).
145. Taubert, H. *et al.* Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma. *Oncogene* **26**, 1098–100 (2007).
146. Chen, C., Liu, J. & Xu, G. Overexpression of PIWI proteins in human stage III epithelial ovarian cancer with lymph node metastasis. *Cancer Biomarkers* **13**, 315–321 (2013).
147. Li, D. *et al.* Piwil2 modulates the proliferation and metastasis of colon cancer via regulation of matrix metalloproteinase 9 transcriptional activity. *Exp. Biol. Med.* **237**, 1231–1240 (2012).
148. Lee, J. H. *et al.* Pathways of proliferation and antiapoptosis driven in breast cancer stem cells by stem cell protein piwil2. *Cancer Res.* **70**, 4569–79 (2010).
149. Zhang, H. *et al.* The expression of stem cell protein Piwil2 and piR-932 in breast cancer. *Surg. Oncol.* **22**, 217–23 (2013).
150. Hashim, A. *et al.* RNA sequencing identifies specific PIWI-interacting small non-coding RNA expression patterns in breast cancer. *Oncotarget* **5**, 9901–10 (2014).
151. Giurato, G. *et al.* iMir: an integrated pipeline for high-throughput analysis of small non-coding RNA data obtained by smallRNA-Seq. *BMC Bioinformatics* **14**, 362 (2013).
152. Liu, J. J. *et al.* Piwil2 is expressed in various stages of breast cancers and has the potential to be used as a novel biomarker. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **3**, 328–37 (2010).
153. Oh, S.-J., Kim, S.-M., Kim, Y.-O. & Chang, H.-K. Clinicopathologic Implications of PIWIL2 Expression in Colorectal Cancer. *Korean J. Pathol.* **46**, 318–23 (2012).
154. He, G. *et al.* Piwil2 expressed in various stages of cervical neoplasia is a potential complementary marker for p16. *Am. J. Transl. Res.* **2**, 156–69 (2010).
155. Gainetdinov, I. V *et al.* Expression profiles of PIWIL2 short isoforms differ in testicular germ cell tumors of various differentiation subtypes. *PLoS One* **9**, e112528 (2014).
156. Lee, J. H. *et al.* Stem-cell protein Piwil2 is widely expressed in tumors and inhibits apoptosis through activation of Stat3/Bcl-XL pathway. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 201–11 (2006).
157. Su, C. *et al.* PIWIL4 regulates cervical cancer cell line growth and is involved in down-regulating the expression of p14ARF and p53. *FEBS Lett.* **586**, 1356–62 (2012).
158. Al-Janabi, O. *et al.* Piwi-like 1 and 4 gene transcript levels are associated with clinicopathological parameters in renal cell carcinomas. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 686–690 (2014).
159. Martinez, V. D. *et al.* Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-

- interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Sci. Rep.* **5**, 10423 (2015).
160. Huang, G. *et al.* Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **15**, 563–8 (2013).
 161. Cheng, J. *et al.* piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer Lett.* **315**, 12–7 (2012).
 162. Cheng, J. *et al.* piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clin. Chim. Acta.* **412**, 1621–5 (2011).
 163. Martinez, V. D., Enfield, K. S. S., Rowbotham, D. A. & Lam, W. L. An atlas of gastric PIWI-interacting RNA transcriptomes and their utility for identifying signatures of gastric cancer recurrence. *Gastric Cancer* **19**, 660–5 (2016).
 164. Li, Y. *et al.* Piwi-Interacting RNAs (piRNAs) Are Dysregulated in Renal Cell Carcinoma and Associated with Tumor Metastasis and Cancer-Specific Survival. *Mol. Med.* **21**, 381–8 (2015).
 165. Busch, J. *et al.* Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell renal cell carcinomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 61 (2015).
 166. Law, P. T.-Y. *et al.* Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **58**, 1165–73 (2013).
 167. Müller, S. *et al.* Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **14**, 94 (2015).
 168. Yan, H. *et al.* piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* **29**, 196–206 (2015).
 169. Mei, Y. *et al.* A piRNA-like small RNA interacts with and modulates p-ERM proteins in human somatic cells. *Nat. Commun.* **6**, 7316 (2015).
 170. Peng, L. *et al.* piR-55490 inhibits the growth of lung carcinoma by suppressing mTOR signaling. *Tumour Biol.* **37**, 2749–56 (2016).
 171. Furuta, M. *et al.* miR-124 and miR-203 are epigenetically silenced tumor-suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **31**, 766–76 (2010).
 172. Bueno, M. J. *et al.* Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* **13**, 496–506 (2008).
 173. Chim, C. S. *et al.* Epigenetic inactivation of the miR-34a in hematological malignancies. *Carcinogenesis* **31**, 745–50 (2010).
 174. Wong, K.-Y. *et al.* Epigenetic silencing of MIR203 in multiple myeloma. *Br. J. Haematol.* **154**, 569–78 (2011).
 175. Chim, C. S. *et al.* Epigenetic inactivation of the hsa-miR-203 in haematological

- malignancies. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 2760–7 (2011).
176. de Souza Rocha Simonini, P. *et al.* Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells. *Cancer Res.* **70**, 9175–84 (2010).
 177. Grady, W. M. *et al.* Epigenetic silencing of the intronic microRNA hsa-miR-342 and its host gene EVL in colorectal cancer. *Oncogene* **27**, 3880–8 (2008).
 178. Hamfjord, J. *et al.* Differential expression of miRNAs in colorectal cancer: comparison of paired tumor tissue and adjacent normal mucosa using high-throughput sequencing. *PLoS One* **7**, e34150 (2012).
 179. Tsai, K.-W., Kao, H.-W., Chen, H.-C., Chen, S.-J. & Lin, W. Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* **4**, 587–92 (2009).
 180. Saba, H. I. Decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**, 807–17 (2007).
 181. Hollenbach, P. W. *et al.* A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One* **5**, e9001 (2010).
 182. Craig, V. J., Cogliatti, S. B., Rehrauer, H., Wündisch, T. & Müller, A. Epigenetic silencing of microRNA-203 dysregulates ABL1 expression and drives Helicobacter-associated gastric lymphomagenesis. *Cancer Res.* **71**, 3616–24 (2011).
 183. Ru, P., Steele, R., Hsueh, E. C. & Ray, R. B. Anti-miR-203 Upregulates SOCS3 Expression in Breast Cancer Cells and Enhances Cisplatin Chemosensitivity. *Genes Cancer* **2**, 720–7 (2011).
 184. Chim, C. S. *et al.* Methylation of miR-34a, miR-34b/c, miR-124-1 and miR-203 in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J. Transl. Med.* **9**, 197 (2011).
 185. Hagemann, S., Heil, O., Lyko, F. & Brueckner, B. Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS One* **6**, e17388 (2011).
 186. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 861–74 (2011).
 187. Cui, L. *et al.* Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers. *Clin. Biochem.* **44**, 1050–7 (2011).
 188. Suzuki, R., Honda, S. & Kirino, Y. PIWI Expression and Function in Cancer. *Front. Genet.* **3**, 204 (2012).
 189. Fujita, K. *et al.* Isolation of germ cells from leukemia and lymphoma cells in a human in vitro model: potential clinical application for restoring human fertility after anticancer therapy. *Cancer Res.* **66**, 11166–71 (2006).

190. Lin, Y. *et al.* Immunosuppressive CD14+HLA-DR(low)/- monocytes in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **117**, 872–81 (2011).
191. Navarro, A. *et al.* A serum microRNA signature associated with complete remission and progression after autologous stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Oncotarget* **6**, 1874–83 (2015).
192. Schotte, D., Pieters, R. & Den Boer, M. L. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. *Leukemia* **26**, 1–12 (2012).
193. Li, H. & Yang, B. B. Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 870–9 (2013).
194. Watanabe, T. & Lin, H. Posttranscriptional regulation of gene expression by Piwi proteins and piRNAs. *Mol. Cell* **56**, 18–27 (2014).

ANNEXOS

Annexos

Annex 1. Revisions dels articles i respostes als revisors

Article primer

24 October 2014

Dr. Andreas Rosenwald
Leukemia and Lymphoma

RE: GLAL-2014-0995: "Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma"

Dear Dr. Rosenwald:

Thank you for your letter of 6 October 2014, informing us of the reviewers' comments on our referenced manuscript. We have modified the manuscript based on these comments as follows:

Reviewer 1:

Comments to the Author

The authors studied 5-Aza-C treatment induced miRNA expression changes in 2 HL cell lines, validated the methylation of the subsequent promoter regions and showed an effect of 5-Aza-C on cell growth. However, the authors did not study the effect of the miRNAs on the 5-Aza-C induced effects on cell growth. This would make the manuscript more attractive. Now it is a limited description with overall limited news value.

Major

1. The authors use circulating B cells as a control, it would be better to use germinal center B cells, which is the proposed normal counterpart.

REPLY: We agree with the reviewer that the perfect control for the MSP analysis would be germinal center B cells instead of peripheral blood B cells. However, we have no possibility

of obtaining germinal center B cells from healthy controls. We recognize that this is a limitation of the study and we have commented this in the discussion as follows:

To validate the 13 miRNAs, we performed MSP analysis and compared the HL cell lines to normal B cells obtained from peripheral blood. One limitation of the present study is that the perfect normal counterpart for this comparison would have been germinal center B-cells instead of peripheral blood B cells; however, no germinal center B-cells were available to us.

2. For the 5-Aza-C treatment the authors used one time point and one concentration, and also just one repeat. These experiments should be repeated to have at least two independent experiments per cell line. Besides fold change the authors should also give Ct values, and comment on the miRNAs that change in only one of the two cell lines. Is this related to higher or lower endogenous levels in untreated samples. The authors should show a heatmap of both untreated and treated cell lines, to allow comparison of the endogenous levels in the untreated samples. Moreover, the authors should comment on the limited overlap between the two cell lines.

REPLY: As suggested by this reviewer, we have modified Figure 1A and we have included as supplementary material a magnification of Figure 1A separated by cell line so that it is now possible to analyze each miRNA independently if desired. The new figure was constructed using the Ct values, as recommended by this reviewer, in order to avoid any misinterpretation of the data due to the endogenous control. Now, it is possible to look at the values of the different endogenous controls included in the TaqMan arrays used. In the present study, we used as endogenous control for further validations RNU48 and no significant changes of this miRNA were observed before and after 5-Aza-dC treatment (L-428 Mean Ct before=23.4 vs after=23.0; L-1236 Mean Ct before=20.6 vs after=20.1). We used the TaqMan miRNA arrays to identify putative methylated miRNAs, but we then validated all the results by MSP and single Taqman arrays (as shown in the different sections of the paper). For this reason, we only performed one replicate of that experiment. As observed by this reviewer, it is true that there exists a limited overlap between the miRNA expression in both cell lines. One possible explanation is the important difference in the patient of origin of each cell line. L-428 was derived from a patient with the nodular sclerosis subtype of HL, while L-1236 came from a patient with mixed cellularity subtype. We have previously shown (Navarro A, et al. Blood 2008) that patient lymph nodes from nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes showed important differences in the miRNA expression pattern, which allowed us to discriminate between the two groups of patients in the unsupervised and in

the supervised analysis. This could explain the part of the lower overlap between the two cell lines used in the present study. We have included this information in the Discussion, as follows:

In the profile phase of the study, we observed relatively low overlap between the two cell lines used, L-428 and L-1236. This could be explained in part by differences in the patients of origin of the cell lines. L-428 was derived from a patient with the nodular sclerosis subtype of HL, while L-1236 came from a patient with mixed cellularity subtype. We have previously observed major differences in the miRNA expression patterns of patient lymph nodes from nodular sclerosis and mixed cellularity subtypes, which could be used to discriminate between the two groups of patients in the unsupervised and the supervised analyses.

3. MSP results should also be shown for B cells, it is unclear how many donors were analyzed. Authors should show both primer sets, also for the cell lines.

REPLY: B cells from four donors were obtained and pooled to get sufficient DNA for MSP analysis. Figure 1B shows the results of the MSP in the B cell pool for the different miRNAs examined. We have included this information in the Methods section of the manuscript. Moreover, MSP analysis showing both primers sets for all studied samples are showed in Figure 1B.

4. In figure 1B, it seems that the PCR efficiency is very different for the different primer sets as used for the MSP. The authors should be careful with their conclusions, as for the weak bands it is inconclusive if both U and M are present or not. Especially for miR-34a, miR-342 and miR-490.

REPLY: We have commented this limitation in the Discussion as follows:

A possible limitation of this experiment is that not all the primer sets used for the MSP analysis can have the same PCR efficiency, since they show some weak bands that could be an unspecific reaction or a partial methylation.

5. Figure 3 and 4 should be combined and shown per cell line.

REPLY: We have combined the figures as suggested and now they are shown as new figure 3.

Minor

1. The authors should show CD19 results as a control in supplementary figures for all experiments.

REPLY: As suggested, we have included this information as Supplementary Figure 1.

2. Numbers in abstract and results are not consistent 10 versus 13.

REPLY: Thirteen miRNAs were identified re-expressed in both L-1236 and L-428 cell lines after AZA treatment, but only 10 of these miRNAs had a CpG island in their promoter region. We have modified the abstract as follows to clarify this:

Ten microRNAs containing CpG islands in their promoter region were re-expressed in both the L-428 and L-1236 cell lines.

3. miRNA names in figure 1 are not readable, the authors should provide a list in supplementary file.

REPLY: We have included a magnification of Figure 1A with readable names and separated by cell line as Supplementary Figure 2.

4. For in situ MSP cases the authors should also show miR-155 levels.

REPLY: In our study, we observed no differences in miR-155 levels before and after AZA treatment; hence there was no evidence that miR-155 can be methylated in HL. For this reason, we believe that analyzing miR-155 by MSP in HL patients would not add any information to the present study. Moreover, we have not identified any CpG island in less than 1000 bp of the miRNA gene, which has been used as the reference in the present study.

5. The conclusion at the end of page 12, is not clear, please explain the three types of epigenetic events and explain how you come to this conclusion.

REPLY: We agree with this reviewer that the conclusion about the three types of methylation is very speculative, and we have eliminated this from the manuscript.

Reviewer 2:

Comments to the Author

The manuscript "Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma" submitted by A. Navarro describes induction of ten microRNAs by demethylating agent 5-aza-dC. For two of these microRNA, that were reported to have tumor suppressor effect, authors show hypermethylation of promoter CpG islands in comparison with normal tissues.

The only novelty of the study is the revealing of miR-34a and miR-203 hypermethylation in HL cell lines and in HRS cells in tumor samples. This study may add to understanding of the role of epigenetics in pathogenesis of Hodgkin lymphoma.

Comments.

1. Page 6 line 16. For analysis of qPCR data authors use calculation method based on additional logarithmic transformation. I cannot assess correctness of this approach, what is R, what is RQ? Why authors did not use conventional comparative Ct or delta-delta Ct method which yields fold of change induction results? This obviously groundless using of additional logarithmic transformation further confuses in Table 1 where in columns the decimal logarithm of Fold Change is referred to as "Fold Change" (although explanation is given in the Legend). Why to force reader to calculate decimal logarithms?

REPLY: As suggested by this reviewer, we have changed Table 1 to show results as $2^{-\Delta\Delta Ct}$. We have modified the Methods section accordingly.

2. P9, lines 22-24. The cell names should be used uniformly: L-1236 or L1236.

REPLY: We have corrected this.

3. P9, line 21. The date of the UCSC access should be indicated.

REPLY: We have indicated the date of UCSC as follows:

The 13 miRNAs were analyzed with UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>; Feb.2009, GRCh37/hg19)

4. P13, line 17. Here and though the whole text of the manuscript: gene and protein names should be written in accordance to Gene Nomenclature.

REPLY: We have modified all the gene names appropriately.

28 November 2014

Dr. Andreas Rosenwald
Leukemia and Lymphoma

RE: GLAL-2014-1120: "Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma"

Dear Dr. Rosenwald:

Thank you for your letter of 11 November 2014, informing us of the reviewer's comments on our referenced manuscript. We have modified the manuscript based on these comments as follows:

Reviewer: 1

Two minor points:

1. Treatment procedure for 5-Aza is not always clear. On page 9 the authors state 24 h treatment then wash and wait for 72 hours for the initial screening for different time points. On page 6 the authors treated for 72 hours with just one concentration, how was this choice made, CD19 control experiments are not shown?

REPLY: In the present work, we first focused on the identification of methylated miRNAs in HL cells. To do this we treated the cells as previously described by Ushmorov et al (Blood 2006, vol 107; reference number 15 in our paper). In the Ushmorov paper, CD19 was identified as a methylated gene in HL, and we therefore decided to use CD19 as a positive control of treatment efficacy (Supplementary Figure 1) before profiling microRNAs. In contrast, in the second part of our study, we analyzed the *in vitro* effectiveness of 5-AZA-dC in HL cell lines. In this part of the study, we did not focus on identifying methylated miRNAs, and the doses used were meant to mimic the concentrations used in the clinic. The concentration of 5-Aza-dC used in this second part of the study was based on the maximum concentrations attained in human plasma at clinical doses (Cmax 0.3-1.6µM). At these doses, we observed re-expression of miR-34a and miR-203.

This information was previously included in the Discussion as follows:

“In the present study, using concentrations of 5-Aza-dC that included the maximum concentrations attained in human plasma at clinical doses (C_{max} 0.3-1.6µM), we have observed a dose-dependent antiproliferative effect at 72 hours in all the HL cell lines.”

In order to clarify this issue, we have now included the following statement in Methods:

“To evaluate 5-Aza-dC in vitro effectiveness, we treated the four HL cell lines daily with concentrations of 5-Aza-dC that included the maximum concentrations (C_{max} 0.3-1.6µM) attained in human plasma at clinical doses (20 nM, 250 nM, 1 µM and 5 µM)...”

2. For MSP primer sets it is unclear why the authors did not perform a qPCR to make the difference calling between methylated and unmethylated more quantitative.

REPLY: We agree with this reviewer that the analysis by qPCR may give a quantitative approach to the study of methylation status of specific genes. However, this technology has not been extensively validated yet. Moreover, in the present study we did not aim to quantify the degree of methylation, we only focused on identifying differentially methylated genes. However, we have included the following statement in the Discussion indicating the need to quantify the degree of methylation of these microRNAs in a future study:

“...warrants further investigation, including the quantification of the degree of methylation of these miRNAs in patient samples, in order to determine the potential clinical applications of our findings.”

We have submitted a clean copy of the revised manuscript, as well as a copy with the edits tracked. Please let us know if you require any further information at this time.

Sincerely,

Alfons Navarro, PhD

4 May 2016

Prof. Mikhail V. Blagosklonny

Editor, *Oncotarget*

RE: 013403 - PiwiRNA-651 as marker of Treatment Response and Survival in Classical Hodgkin Lymphoma

Dear Prof. Blagosklonny:

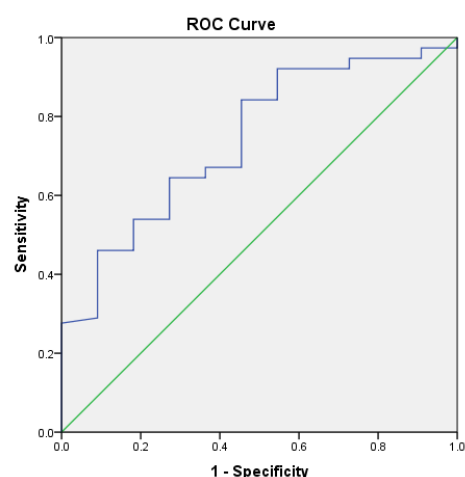
Thank you for your email of 20 March 2016, informing us of the reviewers' comments on our referenced manuscript. We have modified the manuscript based on these comments as follows:

Reviewer #1

I am not an expert in hematological malignancy. This study identified the expression level of PIWIL and piRNA expression level in Hodgkin lymphoma patients and cell lines. And the author finally found piR-651 was associated with OS and DFS in Hodgkin lymphoma patients. Besides, they also detected the serum piR-651 level in Hodgkin lymphoma patients and evaluated the relationship between piR-651 and CR. The study was well designed and the method was reasonable. However, I think they should increase the sample size to further confirm the prognostic and diagnostic results. As for the diagnosis analysis, ROC curves and cut-off values should be calculated. And the author should also provide the statistical power for their current results.

Our reply: We agree with this reviewer that our study would be enhanced by the inclusion of more patients. However, at this time, we do not have additional samples available for analysis. At the end of the Discussion, we mentioned that "further investigation in a larger cohort of patients is warranted..."

As suggested, we have calculated the ROC curve for the analysis of piR-651 and complete response, as shown in the figure below, and we have included this information in Results.



<i>AUC</i>	<i>95% CI</i>	<i>p-value</i>
0.741	0.594-0.888	0.010

However, the selection of the optimal cutoff using ROC curves is a tricky question since sensitivity and specificity might be given different weights. For this reason, in our study we used the cutoff point identified using MaxStat package for survival (0.25). The specificity and sensitivity values for this cutoff are shown here.

<i>Cutoff value</i>	<i>Sensitivity</i>	<i>1-Specificity</i>	<i>Sensitivity + (1-Specificity)</i>
0.25	0.84	0.45	1.29

We have calculated the statistical power using pwr package from R and Power Stimator from StatsToDo (<http://www.statstodo.com>). The statistical power for the Chi-Square analysis of responders vs non-responders according to high/low piR-651 levels is: 0.9998. The statistical power for OS analysis is: 0.7902. The statistical power for DFS analysis is: 0.5318.

We have included all this information in the text as follows:

Using ROC curves to determine the capacity of piR-651 to distinguish responders vs non-responders to first line treatment, we found that piR-651 significantly discriminates between responders and non-responders (AUC: 0.741, 95% CI 0.594-0.888; $p=0.010$). When piR-651 expression was analyzed as a dichotomous variable (cutoff: 0.25; sensitivity: 0.84; 1-specificity: 0.45), lower levels of piR-651 were also associated with treatment failure. Only 7.2% of patients with high piR-651 expression had treatment failure, compared to 66.7% of those with low expression (Fisher's Exact test, $p=0.009$).

Reviewer #2

This study showed that the Piwi/piRNA pathway is active in cHL. They identified piR-651 as a potential biomarker that can be detected in serum. piR-651 may act as a tumor suppressor. More important, piR-651 levels in serum increase at response to treatment.

1. Figure 1: Did you use normal control? The relative expression level should be used.

Our reply: For the experiment included in Figure 1, we initially used as normal control the expression levels of PIWIL1-4 in B cells from peripheral blood. However, PIWIL1 was not expressed in B cells and for that reason we showed the results in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ instead of relative expression. In order to give the same scale in the three PIWI proteins we used the same quantification system in all of them. When we compared PIWIL2 and PIWIL4 expression in cHL cell lines with B cells, we observed that the four cHL cell lines showed a downregulation in the levels of PIWIL2/4 in comparison to B cells. We have included this information in the text, as follows:

When we compared the expression in the cell lines with those in B-cells from peripheral blood from healthy controls, we observed that PIWIL2 and PIWIL4 were downregulated in the HL cell lines, but PIWIL1 was not expressed in the B-cells.

We have modified the graph to show RQ in PIWIL2 and PIWIL4, but in PIWIL1 we had to retain the original figure.

2. Figure 2 and Figure 4: What is the unit of piR-651 level?

Our reply: In both figures piwiRNAs are expressed as $\text{Log}_{10}(2^{-\Delta\Delta Ct})$. We have modified the figures to include this information.

3. Figure 2: What is the control?

Our reply: The control in Figure 2 (now Figure 3) is the mean expression of the reactive lymph nodes.

Reviewer #3

The article "PiwiRNA-651 as marker of Treatment Response and Survival in Classical Hodgkin Lymphoma" is focused on studying Piwi-interacting RNAs in Hodgkin lymphoma. piRNAs represent a relatively novel class of small non-coding RNAs which have been described to be aberrantly expressed in cancer, but their role in tumorigenesis is poorly understood. The authors demonstrated that Piwi/piRNA pathway is active in cHL and that the expression of one piRNA correlates with the clinical outcome. The text and the results are generally clear. However, some figures and analyses need revising to strengthen the article.

1) The authors claim that Piwil4 was detected in the cytoplasm of HRS cells; however, the Piwil4 on Figure 1F seems to be hardly detected. The detection of PIWI proteins by RT-PCR in cell lines should be accompanied by an immunoblot to confirm that this is translated into protein levels.

Our reply: We have eliminated Figure 1D-F and included a new Figure 2 with more representative images of PIWI proteins IHC. Moreover, we have modified Figure 1 to include the immunoblots that confirm that PIWI proteins are expressed in HL cell lines.

2) Due to reduced size and quality of the IHC/ISH photographs (Figures 1 and 5) it would be helpful to include 2-3 arrows indicating HRS cells within the tissue.

Our reply: As requested, we have included the arrows in these figures. The new Figure 2 comprises the images from the original Figure 1D-F.

3) Are the piRNA levels in Figures 2, 3C and 4 depicted in a logarithmic scale? I would recommend using linear (and segmented) rather than logarithmic scale as it could help readers to better see the differences between the groups in Figures 3C and 4.

Our reply: piwiRNA levels were depicted in Log scale. As requested by this reviewer, we have now modified the figures to show piwiRNA expression in linear scale in Figures 3C and 4.

4) The paragraph "piR-651 impacts clinical outcome": The authors show that low expression levels of piR-651 were associated with shorter DFS (83.3 vs. 197.9 months, $p=0.0154$) and shorter OS (117.2 vs. 207.2 months; $p=0.0218$). The survival curves in Figure 3A-B show that in both groups (low vs. high piR-651 expression) the median disease-free/overall survival was not

reached in any group. How the time of survival (83.3 vs. 197.9, 117.2 vs. 207.2 months) was therefore calculated and what does this time mean?

Our reply: It is true that the median time for DFS or OS was not reached in any group. For that reason, we had calculated the mean survival times. We have now specified this in the text as follows:

...were associated with shorter DFS (Mean DFS: 83.3 vs. 197.9 months, $p=0.0154$) and shorter OS (Mean OS: 117.2 vs. 207.2 months; $p=0.0218$).

5) It is not clear if the analysed samples were obtained at diagnosis. If not then the OS analyses should be performed as a delay entry model, including the multivariate part. Did the authors analyse piR-651 levels, age, haemoglobin, albumin and others also as continuous variables?

Our reply: All the samples included in the study were obtained at diagnosis. We have clarified this in Methods as follows:

Total RNA was obtained from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) lymph nodes as previously described[6, 7] using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Life Technologies, Foster City, CA). All patient lymph nodes were obtained at diagnosis.

All the variables included in the multivariate analysis were analyzed using the dichotomous value that has prognostic impact as referenced in the International Prognostic Score (Hasenclever D, *et al.* N Engl J Med 1998). PiR-651 was also included as a dichotomous variable.

6) The paragraph "piR-651 is expressed in HRS cells": The authors performed in situ hybridization "to verify that that the prognostic role of piR-651 was associated with its expression in HRS cells" and conclude that piR-651 was highly expressed in the cytoplasm of HRS cells. However, piR-651 seems to be expressed also in surrounding cells as can be noticed in Figure 5C-D. Furthermore, HRS cells are presented only in a small fraction within the cHL lymph node. Therefore HRS cells have rather minor contribution to piR-651 expression in the analysed samples and its prognostic role in cHL lymph node. Authors should comments on that.

Our reply: As pointed out by this reviewer, piR-651 expression is not exclusive to HRS cells. When we analyzed the piR-651 expression by qPCR in RLNs, we also observed that piR-651 is

expressed by all control lymph nodes. Nevertheless, the expression in patient lymph nodes was significantly higher than in RLN, suggesting that this upregulation is due to the presence of the population of HRS cells, which are expressing piR-651 and at the same time producing changes in the surrounding cells that lead to an increase of global piR-651 levels in the HL lymph node. We have commented on this in the Discussion, as follows:

In fact, the study by in situ hybridization of piR-651 showed that it was expressed not only in HRS cells but also in normal follicles, especially at centroblasts. Interestingly, piR-651 expression in patient lymph nodes was significantly higher than in RLN suggesting that this upregulation is due to the presence of the population of HRS cells, which are expressing piR-651 and at the same time producing changes in the surrounding cells that lead to an increase of global piR-651 levels in the HL lymph node.

7) It would be desirable to include the image from IHC of the negative control used in stainings presented in Figure 5.

Our reply: As requested, we have included the negative control in Figure 5 (now Figure 6).

Reviewer #4

In this manuscript, Cordeiro et al analysed the expression of PiwiRNAs in a series of cHL cell lines and tumor samples, using RT-Q-PCR and immunohistochemistry. Their results indicate that this pathway is active in cHL. Also, they describe an association between piR-651 underexpression and worse clinical outcome, suggesting that piR-651 may act as a tumor suppressor in this tumor model. These findings are novel and may add information to previous data regarding piRNAs deregulation in cancer. However, several issues need further clarification:

1. It would be desirable to explain the rationale for the selection of this disease as a model for piRNAs analyses, since there is no previous data in the literature.

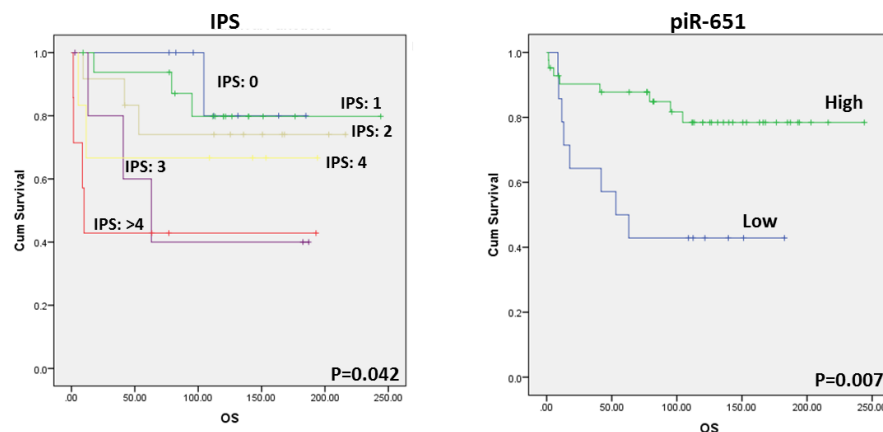
Our reply: PiwiRNAs, small non-coding RNAs processed by Piwi proteins, are involved in maintaining genome stability in germline cells. Recently, piwiRNA expression has been identified in some tumors indicating that their expression is not restricted to germinal cells. However, most of the tumors where piwiRNAs have been identified are tumors where the

stem-cell model can be used to explain the tumorigenesis process. We have studied piwiRNAs in Hodgkin lymphoma, whose tumorigenesis cannot be explained through cancer stem cells since it originates from a differentiated B-cell that escapes from apoptosis. Interestingly, we have observed that piwiRNAs are also detected in HL cells, indicating that they are not exclusive to tumors with a stem-cell origin. Moreover, the research by our group focuses on the study of non-coding RNAs in different pathologies, including HL, where we have previously studied the role of other small non-coding RNAs such as microRNAs. For all these reasons, we decided to explore whether piwiRNAs participates in the tumorigenesis process in HL since as pointed out by this reviewer, there is no previous data in the literature.

2. It is odd that in this series of patients, most of the individual variables of the IPS do not show significant association with survival in multivariate analyses. Independent analyses of the predictive power of the IPS (as a comprehensive variable) on OS and DFS must be included. Also, the results can be clarified with multivariate analyses of IPS and piR-651.

Our reply: The IPS score is only applicable to advanced-stage HL patients and can only be used to predict OS (Hasenclever D, *et al.* N Engl J Med 1998). Only 56 patients of our cohort (N=94) were advanced-stage HL patients. For this reason, we did not include the IPS as a comprehensive variable in the multivariate analysis. Nevertheless, in response to this reviewer's comment, we have performed the multivariate analysis for these 56 advanced-stage patients including IPS and piR-651. piR-651 remained an independent prognostic factor for both DFS and OS. The following figures show the univariate and multivariate results for OS in the 56 patients.

Univariate analysis for OS



Multivariate analyses for DFS and OS

Disease-Free Survival	Odds Ratio (95% CI)	P
IPS ≥ 3		0.979
Low piR-651 expression	6.52 (1.72-24.77)	0.006
Overall Survival	Odds Ratio (95% CI)	P
IPS ≥ 3	3.1 (1.13-8.5)	0.028
Low piR-651 expression	2.92 (1.07-7.93)	0.036

We have included this information in the text as follows:

In the subset of 56 advanced-stage patients, piR-651 retained its impact on both DFS ($p=0.003$) and OS ($p=0.007$), while the IPS was significant only in OS ($p=0.04$). In the multivariate analyses including the IPS score and piR-651, piR-651 emerged as an independent prognostic factor for both DFS (OR, 6.52; 95% CI=1.72-24.77; $p=0.006$) and OS (OR, 2.92; 95% CI=1.07-7.93; $p=0.036$), while IPS was identified as a prognostic factor for OS (OR, 3.1; 95% CI=1.13-8.5; $p=0.028$).

3. Association between piRNA and survival (DFS, OS) was performed using MaxStat, but expression values are not indicated. The range and cut-off of expression can be included in Results and Methods.

Our reply: We have included this information in Results and Methods as follows:

Results: Expression levels were dichotomized using the cutoff identified by MaxStat (cutoff=0.25; mean expression of low group:-0.046 [range:-0.37-0.18]; mean expression of high group: 1.27 [range: 0.26-6.11]). Low expression levels of piR-651 were associated with...

Methods: Optimal cut-offs of piRNA expression data for DFS and OS were assessed by means of maximally selected log-rank statistics using the Maxstat package (R statistical package, v. 2.8.1, Vienna, Austria)[48]. MaxStat identified a significant cutoff only for piR-651(cutoff=0.25; mean expression of low group:-0.046 [range:-0.37-0.18]; mean expression of high group: 1.27 [range: 0.26-6.11]).

4. In Figure 5 it seems that piR-651 is expressed in almost all normal cells (not only centroblasts, but also centrocytes, mantle zone cells, macrophages,...), even at higher levels than in HRS cells. To rule out a technical artefact some negative controls are needed. This fact is quite surprising and must be further discussed.

Our reply: We have included negative controls in Figure 5 (now Figure 6). We have discussed this as follows:

In fact, the study by in situ hybridization of piR-651 showed that it was expressed not only in HRS cells but also in normal follicles, especially at centroblasts. Interestingly, piR-651 expression in patient lymph nodes was significantly higher than in RLN suggesting that this upregulation is due to the presence of the population of HRS cells, which are expressing piR-651 and at the same time producing changes in the surrounding cells that lead to an increase of global piR-651 levels in the HL lymph node.

5. Discussion, page 11: the surprising high expression of piR-651 in the serum of normal individuals is attributed to "hematological alterations associated to the lymphoma". This statement is rather speculative and should be better argued and referenced.

Our reply: We have modified our comments as follows:

In the same line, the analysis of piR-651 in serum samples showed that piR-651 levels were downregulated at diagnosis but increased after treatment when the patient achieved CR. Cui et al. showed that piR-651 analyzed in mononuclear cells from peripheral blood from gastric cancer patients was also lower in comparison with control samples [42]. This leads us to speculate that the expression of piR-651 detected in serum could come from circulating cells rather than from tumor cells and the downregulation observed in the patients could reflect differences in the peripheral blood populations associated to the presence of the lymphoma. It has previously been reported that immune suppression associated with the lymphoma pathogenesis may be found systemically resulting from an altered monocyte phenotype in patients with lymphoma [43].

6. *Figures of immunohistochemistry for Piwi proteins (1D-F) are not very clear. The signal in HRS cells is very faint and Figure 1E seems to have heavy unspecific background. Also, Figure 1E has different magnification than 1D and 1F (it has also an incorrect scale bar). More representative microphotographs should be included in the manuscript.*

Our reply: As requested by this reviewer and by reviewer 3, we have eliminated Figure 1D-F and included a new Figure 2 with more representative images.

7. *The association between piR-651 and complete response to therapy is confusing as presented (page 7), estimated using logistic regression (as a continuous variable) instead of Cox models. To homogenize and to facilitate comparisons it would be desirable to include long-rank test and multivariate Cox models including the IPS, with piR-651 as a dichotomous variable (high versus low). Also, the multivariate analysis was done with non-standard parameters (such as number of cycles of chemotherapy and radiotherapy), but without inclusion of the IPS as standard.*

Our reply: We have modified the explanation of the results related to complete response and piR-651 levels in order to avoid any confusion and we have included univariate information using the dichotomous variable for piR-651, as follows:

When patients were classified as responders or non-responders to first-line treatment, non-responders had lower levels of piR-651 expression in lymph nodes, analyzed as a continuous variable (T-test $p=0.0022$) (Figure 4C). When piR-651 expression was analyzed as a dichotomous variable, lower levels of piR-651 were also associated with treatment failure. Only 7.2% of patients with high piR-651 expression had treatment failure, compared to 66.7% of those with low expression (Fisher's Exact $p=0.009$)

As reported in Logistic Regression by Todd G. Nick and Kathleen M. Campbell (in Topics in Biostatistics. Ed. Walter T Ambrosius, ISBN 978-1-59745-530-5), "Logistic regression models are used to study effects of predictor variables on categorical outcomes and normally the outcome is binary" – in our study, response to treatment vs treatment failure. Moreover, the IPS score is only applicable to advanced-stage HL patients and can only be used to calculate OS (Hasenclever D, *et al.* N Engl J Med 1998). Therefore, the IPS was not included in the multivariate analysis for treatment response.

8. The number of cases in which piR-651 was evaluated in serum should be included in the text and in Figure 4. Are the same cases also included in the in situ hybridization analyses?

Our reply: As requested by the reviewer, we have included the number of cases studied in Figure 4 (now Figure 5) and in Results.

Associate Editor comments:

Manuscript, especially Abstract, should be edited. Please, delete irrelevant "general" phrases and sentences. Delete unneeded words. Simplify. Use short sentences. Some Introductory sentences are irrelevant or are not needed. Shorten MS, especially Discussion. Try to avoid vague words: regulate, modulate, affect, manipulate, interact, play role, target, closely related, dependent, mediated, impact ... Instead use concrete words: increase, decrease, stimulate/activate, inhibit/suppress, bind, correlate. For example, instead of "regulate" use either increase or decrease, activate or inhibit.

Our reply: We have followed the suggestions of the Associate Editor and have simplified and shortened the manuscript and have avoided the use of vague words.

We have submitted a clean copy of the revised manuscript, as well as a copy with the edits tracked. Please let us know if you require any further information at this time.

Sincerely,

Alfons Navarro, PhD
School of Medicine
University of Barcelona
Casanova 143
08036 Barcelona
Phone: 934021903
anavarroponz@ub.edu

Annex 2. Altres publicacions realitzades durant el període pre-doctoral

1. LincRNA-p21 impacts prognosis in resected non-small-cell lung cancer patients through angiogenesis regulation.

Castellano JJ, Navarro A, Viñolas N, Marrades RM, Moises J, **Cordeiro A**, Saco A, Muñoz C, Fuster D, Molins L, Ramirez J, Monzo M.

J Thorac Oncol. 2016 Aug 2.pii: S1556-0864(16)30692-X. doi: 10.1016/j.jtho.2016.07.015. In press

PMID: 27496652

2. Identifying High-Risk Stage II Colon Cancer Patients: A Three-MicroRNA-Based Score as a Prognostic Biomarker.

Caritg O, Navarro A, Moreno I, Martínez-Rodenas F, **Cordeiro A**, Muñoz C, Ruiz-Martinez M, Santasusagna S, Castellano JJ, Monzó M.

Clin Colorectal Cancer. 2016 May 7. pii: S1533-0028(16)30056-1. doi: 10.1016/j.clcc.2016.04.008. In press

PMID: 27247088

3. The lincRNA HOTAIRM1, located in the HOXA genomic region, is expressed in acute myeloid leukemia, impacts prognosis in patients in the intermediate-risk cytogenetic category, and is associated with a distinctive microRNA signature.

Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, Pratcorona M, **Cordeiro A**, Gallardo D, Escoda L, Tormo M, Heras I, Ribera JM, Duarte R, de Llano MP, Bargay J, Sampol A, Nomdedeu M, Risueño RM, Hoyos M, Sierra J, Monzo M, Navarro A, Esteve J; Cooperative AML group CETLAM.

Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):31613-27. doi: 10.18632/oncotarget.5148.

PMID: 26436590

4. The expression level of BAALC-associated microRNA miR-3151 is an independent prognostic factor in younger patients with cytogenetic intermediate-risk acute myeloid leukemia.

Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, **Cordeiro A**, Tormo M, Escoda L, Ribera JM, Arnan M, Heras I, Gallardo D, Bargay J, Queipo de Llano MP, Salamero O, Martí JM, Sampol A, Pedro C, Hoyos M, Pratcorona M, Castellano JJ, Nomdedeu M, Risueño RM, Sierra J, Monzó M, Navarro A, Esteve J.

Blood Cancer J. 2015 Oct 2;5:e352. doi: 10.1038/bcj.2015.76.

PMID: 26430723

5. The significance of PIWI family expression in human lung embryogenesis and non-small cell lung cancer.

Navarro A, Tejero R, Viñolas N, **Cordeiro A**, Marrades RM, Fuster D, Caritg O, Moises J, Muñoz C, Molins L, Ramirez J, Monzo M.

Oncotarget. 2015 Oct 13;6(31):31544-56. doi: 10.18632/oncotarget.3003.

PMID: 25742785

6. miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma.

Tejero R, Navarro A, Campayo M, Viñolas N, Marrades RM, **Cordeiro A**, Ruíz-Martínez M, Santasusagna S, Molins L, Ramirez J, Monzó M.

PLoS One. 2014 Jul 8;9(7):e101899. doi: 10.1371/journal.pone.0101899. eCollection 2014.

PMID: 25003366

7. Role of miR-200 family members in survival of colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines.

Díaz T, Tejero R, Moreno I, Ferrer G, **Cordeiro A**, Artells R, Navarro A, Hernandez R, Tapia G, Monzo M.

J Surg Oncol. 2014 Jun;109(7):676-83. doi: 10.1002/jso.23572. Epub 2014 Feb 10.

PMID: 24510588

Annex 3. Treballs presentats a congressos durant el període pre-doctoral

1. Variaciones genéticas en la vía PIWI/piRNA tienen impacto pronóstico en la supervivencia libre de enfermedad en el Linfoma de Hodgkin clásico
Anna Cordeiro, Alfons Navarro, Anna Gaya, Carmen Martínez, Blanca Gonzalez-Farré, Marina Díaz-Beyá, Joan Josep Castellano, Marc Ruiz-Martínez, Sandra Santasusagna, Carmen Muñoz, Antonio Martínez, Mariano Monzó
LVIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Santiago de Compostela, Galicia, 20-22/10/2016)
2. La via PIWI/piRNA: paper pronòstic del piR-651 en el Limfoma de Hodgkin clàssic
Anna Cordeiro; Anna Gaya; Marina Díaz-Beyá; Blanca Gonzalez-Farré; Joan Josep Castellano; Oriol Caritg; Marc Ruiz-Martínez; Sandra Santasusagna; Carme Muñoz; Dolors Fuster; Carmen Martínez; Antonio Martínez; Mariano Monzó; Alfons Navarro.
40^a Diada Internacional de la Societat Catalana d'Hematologia i Hemoteràpia (Barcelona, Catalunya, 03/06/2016)
3. lincRNA-p21 Impacts Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Adenocarcinoma Patients
Jorge Moises; Joan J Castellano Perez; Josep Ramirez; **Anna Cordeiro Santanach**; Nuria Viñolas; Adela Saco; Marc Ruiz Martinez; Sandra Santasusagna Canal; Francisco Aya; Laureano Molins; Alfons Navarro Ponz; Mariano Monzo Planella; Ramon M Marrades.
Annual congress 2016 of the American Thoracic Society (San Francisco, EUA, 13-18/05/2016)
4. Prognostic Significance of lincRNA-p21 in Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC)
Josep Ramirez; Joan J Castellano Perez; Adela Saco; Jorge Moises; **Anna Cordeiro Santanach**; Ramon M Marrades; Nuria Viñolas; Francisco Aya; Laureano Molins; Mariano Monzo Planella; Alfons Navarro Ponz.
2016 Annual Meeting of the USCAP (Seattle, EUA, 12-18/03/2016)

5. Exploring the Expression Profile of Long Non-Coding RNA (lncRNA) in Different Acute Myeloid Leukemia (AML) Subtypes: t(8;16)(p11;p13)/MYST3-Crebbp AML Harbors a Distinctive Lncrna Signature
Marina Díaz Beyá; Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Marta Pratcorona; Joan Josep Castellano Pérez; Miguel Angel Torrente; Meritxell Nomdedeu; Ruth Risueño; Maria Rozman; Mariano Monzó Planella; Jordi Esteve.
57th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (Orlando, EUA, 5-8/12/2015)

6. Los RNAs no codificantes largos muestran un perfil de expresión distintivo entre diferentes subtipos de LMA, como la LMA con t (8;16) (p11;p13) /MYST3-CREBBP
Marina Díaz Beyá; Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Joan J Castellano Perez; MA Torrente; Marta Pratcorona; Meritxell Nomdedeu; Ruth Risueño; Mireia Camós; Mariano Monzo Planella; Jordi Esteve
LVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Valencia, Comunidad Valenciana, 22-24/10/2015)
Haematologica October 2015 100:142-143

7. PIWI proteins as prognostic markers in non small cell lung cancer
Jorge Moisés; Alfons Navarro Ponz; Rut Tejero Villalba; Nuria Viñolas; **Anna Cordeiro Santanach**; Ramon M Marrades; Dolors Fuster Botella; Oriol Caritg Cirera; Carmen Muñoz Garcia; Laureano Molins; Josep Ramirez; Mariano Monzo Planella
Annual Congress of the European Respiratory Society (Àmsterdam, Holanda, 26-30/06/2015)

8. A distinctive long-non coding RNA signature characterizes acute myeloid leukemia with translocation T (8; 16)(P11; P13) and MYST3-CREBBP rearrangement
Marina Díaz Beyá; Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Marta Pratcorona; Joan J Castellano Perez; Meritxell Nomdedeu; Ruth Risueño; MA Torrente; Mireia Camós; Mariano Monzo Planella; Jordi Esteve
20th Congress of European Hematology Association (Vienna, Àustria, 11-14/06/2015)

9. The large non coding RNAs show a polifles of distinctive expression bwjetween diferent subtypes of LMA, as LMA with T (8; 16)(P11; P13)/MYST3-CREBBP
 Marina Díaz Beyá; Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Joan J Castellano Perez; MA Torrente; Marta Pratcorona; Meritxell Nomdedeu; Ruth Risueño; Mireia Camós; Mariano Monzo Planella; Jordi Esteve
 20th Congress of European Hematology Association (Vienna, Àustria, 11-14/06/2015)
 Haematologica June 2015 100:207

10. Expresión y valor pronóstico de las proteínas PIWI en Cancer de Pulmón de Célula No Pequeña
 Jorge Moisés; Rut Tejero Villalba; Alfons Navarro Ponz; Adela Saco; **Anna Cordeiro Santanach**; Núria Viñolas; M Paradela; Laureano Molins; Josep Ramirez; C Agustí; Mariano Monzó; Ramon M Marrades
 Congreso nacional de la Sociedad Española de Pneumología y Cirugía Torácica (Las Palmas de Gran Canaria, Canarias, 5-8/06/2015)

11. piRNA-651 as prognostic marker in surgically resected non-small-cell lung cancer. Nuria Viñolas; Francisco Aya; Alfons Navarro Ponz; Ramon M Marrades; **Anna Cordeiro Santanach**; Aranzazu Fernandez; Nuria Chic; Josep M Gimferrer; Jose Ramirez; Laureano Molins; Mariano Monzo Planella.
 2015 American Society of Clinical Oncology Annual Meeting (Chicago, EUA, 29/05-02/06/2015)

12. Expresión y valor pronóstico de las proteínas PIWI en Càncer de Pulmón de Célula No Pequeña.
 Jorge Moisés; Rut Tejero Villabla; Alfons Navarro Ponz; Adela Saco; **Anna Cordeiro Santanach**; Nuria Viñolas; M Paradela; Laureano Molins; Josep Ramirez; C Agustí; Mariano Monzó; Ramon M Marrades.
 Diada Pneumològica de la Societat Catalana de Pneumologia (L'Hospitalet de Llobregat, Catalunya, 17-18/04/2015)

13. PiwiRNA-651 Expression Influences Treatment Response and Impacts Survival in Classical Hodgkin Lymphoma Patients through Regulation of ABCC5
Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Anna Gaya; Blanca Gonzalez Farre; Marina Díaz Beyá; Dolors Fuster Botella; Carmen Martinez; Jordi Esteve; Antonio Martinez
56th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (San Francisco, EUA, 6-9/12/2014)
Blood Dec 2014, 124 (21) 134
14. The LincRNA HOTAIRM1, Located in the HOXA genomic Region, impacts Prognosis in Acute Myeloid Leukemia and Is Associated with a Distinctive microRNA Signature
Marina Díaz Beyá; Alfons Navarro Ponz; Salut Brunet; Josep F Nomdedeu; **Anna Cordeiro Santanach**; Marta Pratcorona; Meritxell Nomdedeu; Ruth M Risueño; Josep-Maria Ribera; Mar Tormo; Rafael F. Duarte; Olga Salamero; Lourdes Escoda; David Gallardo; Carmen Pedro; Josep M Marti Tutusaus; Jorge Sierra; Mariano Monzó Planella
56th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (San Francisco, EUA, 6-9/12/2014)
Blood Dec 2014, 124 (21) 1003
15. Los piwiRNAs, ARNs no codificantes germinales, estan activos en el linfoma de Hodgkin y actuan como marcadores pronósticos
Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Anna Gaya; Blanca González Farre; Marina Díaz Beyá; Dolors Fuster Botella; Rut Tejero Villalba; Marc Ruiz Martinez; Sandra Santasusagna Canal; Carmen Muñoz Garcia; Oriol Caritg Cirera; Carmen Martinez; Antonio Martinez; Mariano Monzo Planella.
LVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Madrid, 6-8/11/2014)

16. Germline small non coding RNAs, piwiRNAs, are expressed in Hodgkin Lymphoma: the role of piwiRNAs-651 as prognostic factor in Hodgkin Lymphoma
Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Anna Gaya; Blanca Gonzalez Farre; Marina Díaz Beyá; Dolors Fuster Botella; Rut Tejero Villalba; Marc Ruiz Martinez; Sandra Santasusagna Canal; Carmen Muñoz Garcia; Oriol Caritg Cirera; Carmen Martinez; Antonio Martinez; Mariano Monzó Planella
19th Congress of the European Hematology Association (Milano, Itàlia, 12-15/06/2014)
Haematologica June 2014 99:408
17. Prognostic Significance OF a 4-Microrna Signature Targeting JAK2 in Classical Hodgkin Lymphoma
Alfons Navarro Ponz; Anna Gaya; **Anna Cordeiro Santanach**; Blanca Gonzalez Farre; Marina Díaz Beyá; Dolors Fuster Botella; Carmen Martinez; Jordi Esteve; Antonio Martinez; Mariano Monzo Planella
55th Annual Meeting and Exposition of the American Society of Hematology (New Orleans, EUA, 7-10/12/2013)
Blood Nov 2013, 122 (21) 629
18. Papel pronóstico de la regulación por microRNAs de la vía de JAK2 en el linfoma de Hodgkin
Alfons Navarro Ponz; **Anna Cordeiro Santanach**; Anna Gaya; Victor Círia; Marina Díaz Beyá; Carmen Martinez; Antonio Martinez; Mariano Monzo Planella.
LV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (Sevilla, Andalusia, 17-19/10/2013)

Annex 4. Protocols

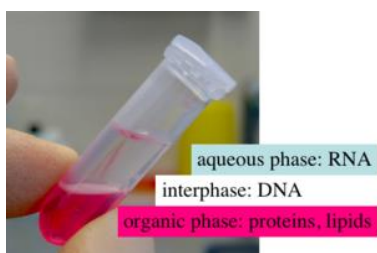
1. Extracció d'ARN de línies cel·lulars

L'ARN total de les línies cel·lulars s'ha extret amb *Trizol total RNA isolation reagent* (Life Technologies, Carlsbad, CA) seguint el protocol del fabricant amb petites modificacions:

Material

- Tubets d'1.5 ml
- Pipetes i puntes
- Xeringues i agulles
- Hisops
- H₂O_{DD}
- Cloroform
- Etanol 75%
- Isopropanol

1. Fer un pellet amb les cèl·lules en cultiu
2. Fer un rentat amb 1 ml de PBS
3. Homogeneïtzar el pellet amb 0.5 ml de Trizol amb una xeringa i agulla per disgregar totes les cèl·lules
4. Incubar 5 minuts a temperatura ambient.
5. Afegir a cada tubet 0.1 ml de cloroform.
6. Sacsejar fort durant 15 segons.
7. Incubar 15 minuts a temperatura ambient (TA).
8. Centrifugar els tubs a 12000g durant 15 minuts a 4°C.
9. Aïllar la fase superior (aquosa) en un tubet nou. Conservarem les altres dues fases ja que d'elles se'n poden extreure DNA i proteïnes.



10. Per precipitar l'ARN, afegirem 0.25 ml d'isopropanol.
11. Invertir el tubet unes quantes vegades per barrejar-ho bé.
12. Incubar la mostra a temperatura ambient durant 10 minuts.
13. Centrifugar la mostra a 1200g durant 10 minuts a 4°C.
14. Descartar el sobrenedant.
15. Afegir 0.5 ml d'etanol al 75% a cada tub i agitar-ho bé.
16. Centrifugar la mostra a 7500g durant 5 minuts a 4°C i descartar el sobrenedant.
17. Deixar assecar a l'aire l'excés d'etanol.
18. Resuspendre el pellet de RNA en aigua lliure de RNAasa i pipetejar bé (el volum d'aigua utilitzat serà proporcional al volum del pellet).
19. Incubar 10-15 minuts a 55-60°C.
20. Quantificar amb el NanoDrop
21. Congelar a -80°C o usar directament.

2. Extracció d'ARN de ganglis

Per als nostres estudis partim de ganglis inclosos en parafina. Per poder-los extreure utilitzarem el kit “RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation” (Life Technologies AM1975). En un tub de 2 ml, hi situarem 10 talls de 5 µm.

Material

- Tubets d'1.5 ml
- Tubets de 2 ml
- Pipetes i puntes
- H₂O_{DD}
- Etanol 100%
- Bany sec

Desparafinació

1. Afegir 1ml de xilol i fer un vòrtex
 2. Incubar 3 minuts a 50°C
 3. Centrifugar 2 minuts a màxima velocitat (si no hi ha pellet, repetir el pas)
 4. Eliminar el sobrenedant
 5. Rentar el pellet amb 1 ml d'etanol al 100% i fe un vòrtex
 6. Centrifugar a 14000 rpm 2 minuts
 7. Eliminar el sobrenedant
 8. Incubar durant 10-15 minuts amb el tub obert
- } Dues vegades

Digestió amb proteasa

9. Afegir 400 µl de *Digestion buffer*
10. Afegir 4 µl de proteasa i fer un vòrtex
11. Incubar durant 3 hores al bany sec a 50°C

Aïllament d'àcids nucleics (augmentar la temperatura del bany a 95°C)

12. Si no ho està, passar la barreja a un tubet de 2 ml

13. Afegir 480 µl d'*Isolation additive* i fer un vòrtex
14. Afegir 1.1 ml d'etanol al 100% i pipetejar amb cura
15. Passar 700 µl de la mostra a una columna
16. Centrifugar a 10000 rpm durant 30-60 segons
17. Descartar el líquid del tub col·lector
18. Rentat amb 700 µl de *Wash 1*
19. Centrifugar a 10000 rpm durant 30-60 segons
20. Descartar el líquid del tub col·lector
21. Rentat amb 500 µl de *Wash 2/3*
22. Centrifugar a 10000 rpm durant 30-60 segons
23. Descartar el líquid del tub col·lector
24. Centrifugar la columna buida a 10000 rpm durant 30 segons
25. Passar la columna a un tub nou

Fins que s'acabi la mostra
(normalment tres vegades)

Digestió amb la nucleasa i purificació (preescalfar H₂O_{dd} a 95°C)

26. Preparar una màster per tantes mostres com hi hagi:
 - a. 6 µl de *10x Dnasa buffer*
 - b. 4 µl de *Dnasa*
 - c. 50 µl d'H₂O_{dd}
27. Afegir 60 µl de la màster a la columna
28. Deixar incubar 30 minuts a TA
29. Afegir 700 µl de *Wash 1*
30. Incubar durant 30-60 segons a TA
31. Centrifugar a 10000 rpm durant 30 segons
32. Descartar el líquid del tub col·lector
33. Rentat amb 500 µl de *Wash 2/3*
34. Centrifugar a 10000 rpm durant 30 segons
35. Descartar el líquid del tub col·lector
36. Centrifugar la columna buida a 10000 rpm durant 1 minut
37. Passar la columna a un tubet d'1.5 ml
38. Afegir 30 µl d'*Elution solution* (reescalfada a 95°C)
39. Incubar 1 minut a TA
40. Centrifugar 1 minut a màxima velocitat
41. Quantificar
42. Fer servir o congelar a -80°C.

Dues vegades

Dues vegades

3. Extracció d'ARN de sèrum

L'ARN total de les línies cel·lulars s'ha extret amb el kit "miRNeasy Mini Kit" de Qiagen (ref. 217004) seguint el protocol del fabricant amb petites modificacions:

Material:

- 1 tub de 15 ml
- MS2 RNA (ref: RNA, MS2 from bacteriophage MS2, 10165948001 de Roche)
- Tubets 1,5 ml
- miRNeasy Mini Kit de QIAGEN REF: 217004 (50 reaccions)
- Aigua MiliQ

1. Posar les mostres i l'MS2 RNA en gel
2. Refredar la centrífuga a 4°C
3. Posar 250 µl de la mostra en un tub d'1,5 ml
4. Centrifugar a 3000g a 4°C durant 5 min (per netejar)
5. Posar 200 µl del "sobrenedant" a un tub d'1.5 ml
6. Fer la màster-mix QIAzol
 - a. 800 µl de QIAzol
 - b. 1.25 µl de MS2 RNA
 - c. Vòrtex contundent
7. Afegir a cada mostra 750 µl de la màster-mix i fer un vòrtex
8. Incubar 5 min a TA
9. Afegir 200 µl de cloroform i fer un vòrtex
10. Incubar 2 min a TA
11. Centrifugar a 12000g a 4°C durant 15 min.
12. Escalfar la centrífuga a 20-25°C
13. Passar la fase aquosa (la superior) a un tub de 2 ml
14. Afegir 1.5 vol d'etanol 100% i pipetejar
15. Passar 750 µl de la mostra a la columna
16. Centrifugar 30 segons a TA a 13000g (descartar el filtrat)
17. Repetir 15-16 fins que no quedi mostra
18. Rentat amb 700 µl RWT

19. Centrifugar 1 min a TA a 13000g (descartar filtrat)
20. Rentat amb 500 µl RPE
21. Centrifugar 1 min a TA a 13000g (descartar filtrat)
22. Repetir 20-21
23. Repetir 20-21
24. Centrifugar la columna buida amb tub col·lector nou 2 min a TA a 13000g
25. Deixar les columnes obertes 1 min per evaporar les restes d'alcohol
26. Passar les columnes a tubs RNase-free
27. Afegir 50 µl d'aigua DNase/RNase free (que toqui la membrana!!!)
28. Incubar 1 min
29. Centrifugar 1 min a TA a 13000g
30. Guardar RNA a -80°

4. Anàlisi dels nivells d'ARNm mitjançant PCR a temps real

Aquest procediment es realitza en dos passos utilitzant un kits comercial i sondes comercials de Life Technologies. El primer pas ens permetrà generar ADNc que, mitjançant primers específics, al segon pas podrem detectar l'expressió dels diferents ARNm.

ADNc: Per obtenir l'ADNc utilitzarem el kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” que ens permetrà el pas de ARN a ADN. Per a una reacció utilitzarem les següents proporcions:

x1	Vf= 20 µl
10x RT Buffer	2 µl
25x dNTPs Mix	0.8 µl
10x RT Random Primers	2 µl
MSCRT	1 µl
RNAse Inhibitor	1 µl
Aigua	3.2 µl
ARN	500 ng en 10 µl

- 25°C → 10 minuts
- 37°C → 2 hores
- 85°C → 5 minuts

PCR a temps real: Per fer la PCR a Temps Real, que ens permetrà quantificar la concentració relativa de ADNc, utilitzarem sondes específiques per a cada missatger. Per a una reacció utilitzarem les següents proporcions:

x1	Vf= 10 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix	5 µl
H ₂ O _{dd}	3.5 µl
Sonda	0.5 µl
ADNc motllo	1 µl

- 50°C → 2 minuts
- 95°C → 10 minuts
- 95°C → 15 segons

• 60°C → 1 minut

 } 40 cicles

5. Western Blot

Extracció de proteïna

1. Necessitem entre **30-50 µl** (depenent número cèl·lules) de buffer de lisi (BL) per cada mostra. Per 10 ml necessitem:
 - a. 200 µl Tris-HCl pH 7.5
 - b. 300 µl NaCl 5M (al final ha d'estar a 150 mM)
 - c. 100 µl de Tritó
 - d. Afegir fins a 10 ml amb aigua MiliQ
2. S'ha de fer una alíquota de BL al moment:

Per cada 100 ul de buffer de lisi:

- 2 µl de cocktail inhibidor de proteases 50x
- 1 µl d'ortovanadat de sodi 100x (inhibidor fosfatases)

3. Deixar la mostra en gel i fer vòrtex cada 5 min, mínim una hora
4. Centrifugar a 14.000 rpm 15 minuts a 4°C
5. Recollir el sobrenedant on hi ha les proteïnes

Quantificació de proteïna

6. Farem una recta patró amb BSA 1M:

Concentració	BSA µl	Aigua µl
0	0	200
1	0.25	199.75
2.5	0.625	199.375
5	1.25	198.75
7.5	1.875	198.125
10	2.5	197.5
15	3.75	196.25
20	5	195
Mostra x2	0.5 mostra	199.5
Blanc	0.5 BL	199.5

7. Afegir 50 µl de Bradford a cada pou, tapar de la llum i reposar 30 minuts.
8. Llegir amb l'espectrofotòmetre a 595 nm.

Electroforesi

9. Un cop quantificades les mostres, ajustarem els volums amb BL i hi afegirem l'LSD sample (REF: B0007 Life Technologies) i el Reducing agent (REF: B0009 Life Technologies).
10. Desnaturalitzar les mostres a 70º durant 10 minuts.
11. Muntarem la cubeta on posarem el gel i el tampó d'electroforesi a 1x (400 ml).
 - a. MES 20x (REF: B0002Life Technologies): Ideal bandes <14kDa
 - b. MOPS 20x (REF: B0001 Life Technologies): Ideal bandes grosses
12. Carreguem 7 µl de marcador de pes molecular (REF: LC5925Life Technologies) i les mostres (màxim 30 µl per pou)
13. Posar la font a 300V i deixar córrer ~20 min (MES) o ~30 min (MOPS).

Transferència (Utilitzant iBlot2)

14. Retirem el gel del suport amb compte i l'incubem amb etanol al 20% durant 5-10 minuts (incrementar eficiència de transferència).
15. Obrim el paquet de la membrana (PVDF: IB24002 i nitrocel·lulosa: IB23002) i fem el muntatge a l'iBlot2:
 - a. Retirar la part de dalt del separador (coure)
 - b. Col·locar la resta que encaixi amb les ranures de l'iBlot2
 - c. Posar el gel sobre la membrana tal qual el vulguem
 - d. Posem a sobre un filtre humit amb aigua MQ i passem el rodets per treure les bombolles.
 - e. Posem a sobre el coure i tornem a treure les bombolles amb el rodets
 - f. Posem a sobre el filtre absorbent amb la llengüeta metàl·lica que faci contacte amb la màquina.
16. Tanquem la tapa i **triem el programa adequat segons la mida de la nostra proteïna.**
17. Acabat el programa, obrim la tapa i retirem la membrana.
18. Tenyir el gel amb Coomassie per veure si la transferència s'han realitzar correctament

Bloqueig

19. Incubar la membrana durant 1 hora en agitació:

- 0.75g de llet en pols/BSA + 15 ml TBS-T al 0.05% (0.1% i 4°C si hi ha molt background)

Anticòs primari

20. Incubarem la membrana en 5 ml solució de bloqueig i l'anticòs primari en una bosseta.

21. Ho deixarem O/N a 4°C donant voltes amb la nòria.

22. L'endemà, farem 3 rentats de 10 minuts amb TBS-T.

Anticòs secundari - HRP

23. Incubarem la membrana en 15 ml solució de bloqueig i l'anticòs secundari en una placa a TA.

24. 3 µl d'anticòs si són 1/5000 i ho deixem 2 hores. (Potser cal ajustar-ho depenent 2^o)

25. Fem **dos** rentats de 10 minuts amb **TBS-T**.

26. Fem **un** rentat de 10 minuts amb **TBS**.

Revelat (ECL)

27. Fem un rentat de 2-5 minuts amb aigua de l'aixeta.

28. Incubem amb la solució de revelat (fer barreja 1:1 dels dos reactius) 1 minuts, en agitació i tapat de la llum.

29. Eixuguem amb compte la membrana amb paper de filtre i la posem dins del calaix.

30. Tanquem la porta i amb Chemi High Sensitivity fem una tira de fotografies

31. Fem la fotografia del marcador:

- Select -> custom -> MW western visible
- Filtre en posició 1
- Encendre llum Epi White
- Fem una foto amb AUTO-EXPOSE (si no ens la fa, tanquem una mica més l'iris i tornem a provar-ho, fins que ens la deixi fer)

32. Solapem les imatges (marcador i banda):

- Deixem les dues fotos obertes
- View -> Multi-channelviewer
- Export TIFF (marcar "same as scan")

33. Quantificar un cop tinguem les dues composicions (proteïna estudiada i control)

6. Immunohistoquímica

S'utilitza per tal d'observar la morfologia dels teixits i la localització de la nostra proteïna d'estudi.

Desparafinació manual

1. Submergir en xilol durant 10 minuts, 3 vegades
2. Rentar amb alcohol
3. Submergir en etanol al 99% durant 10 minuts, 3 vegades
4. Submergir en etanol al 96% durant 10 minuts, 3 vegades
5. Rentar amb aigua de l'aixeta

Tinció hematoxilina/eosina

1. Submergir el portaobjectes en hematoxilina de Harris durant 10 minuts
2. Rentar amb aigua de l'aixeta corrent
3. Decolorar amb HCl 30-45 segons (unes quantes "sucades" amb la cistelleteta)
4. Submergir en aigua amoniacal per virar l'hematoxilina
5. Rentar amb aigua de l'aixeta corrent durant 5 minuts
6. Submergir en eosina durant 10 minuts
7. Rentar amb aigua de l'aixeta corrent
8. Submergir en etanol al 96% durant 10 minuts, 3 vegades
9. Submergir en etanol al 99% durant 10 minuts, 3 vegades
10. Submergir en xilol durant 10 minuts, 2 vegades
11. Deixar assecar a l'aire
12. Muntar amb DPX

7. Quantificació dels piRNAs per SYBR Green

Aquest procediment es realitza en dos passos utilitzant dos kits comercials de Qiagen. El primer ens permetrà allargar la seqüència dels piwiRNAs, utilitzant un primer universal i un enzim poli-A, per tal de poder utilitzar primers específics al segon pas.

ADNc

Per obtenir l'ADNc utilitzarem *miScript II RT Kit (Qiagen)* que ens permetrà el pas de ARN a ADN. Per a una reacció utilitzarem les següents proporcions:

x1	Vf= 10 µl
Buffer HiFlex	2 µl
10x miScript Nucleics Mix	1 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 µl
RNA a amplificar	250 ng per teixit 100 ng per sèrum
H ₂ O _{dd}	0-6 µl, en funció de l'ARN

- 37°C → 1 hora
- 95°C → 5 minuts

Un cop acabat el primer pas, es pot guardar en gel si no s'utilitza al moment o diluir-ho si es vol fer el segon pas a continuació. Es recomana de afegir un volum mínim de 200 µl d'aigua MiliQ per assegurar-nos 0.5-3 ng d'ADNc per a la PCR a Temps Real.

Aquest ADNc és universal, de manera que fent-ne una sola reacció, podem analitzar diferents piRNAs en la fase següent.

PCR a temps real

Per fer la PCR a Temps Real, que ens permetrà quantificar la concentració relativa de ADNc, utilitzarem *miScript SYBR Green PCR Kit* (Qiagen). Per a una reacció utilitzarem les següents proporcions:

x1	Vf= 10 µl
2x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	5 µl
Primer universal	1 µl
Primer específic	1 µl
ADNc motllo	1 µl
H ₂ O _{dd}	2 µl

- 95°C → 15 minuts, per activar la polimerasa Hot-Start
 - 94°C → 15 segons, desnaturalització
 - 55-62°C → 30 segons, *annealing*
 - 70°C → 34 segons, extensió
 - Corba de dissociació (per comprovar que l'amplificació sigui específica)
- } 40 cicles

8. Hibridació *in situ* amb sondes LNA pel piR-651

Partirem de seccions de gangli parafinades col·locades en un portaobjectes

Desparafinació a màquina

1. Submergir la mostra en *DAKO Retrieval Solution* (1:10) 10 minuts a 95°C
2. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* (1:10) durant 5-10 minuts

Tractament amb proteasa

3. Cobrir la secció de teixit amb proteïnasa K i deixar actuar uns 10-15 minuts a 37°C
4. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts
5. Enganxar un marc adhesiu que inclogui tot el tall al seu interior

Hibridació *in situ*

6. Desnaturalitzar la sonda a 80°C durant 5 minuts
7. Fer dilució d'ús de la sonda a 1:100
8. Incubació de la sonda durant 2 hores a 52°C

Rentats

9. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5-10 minuts en agitació
10. Eliminar el tampó de rentat

Bloqueig de la peroxidasa endògena

11. *Peroxidase block DAKO* durant 10 minuts
12. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
13. Eliminar el tampó de rentat

Incubació amb anti-FITC i revelat

14. Incubar amb l'anticòs primari ANTI-FITC durant 1 hora
15. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
16. Eliminar el tampó de rentat
17. Incubar amb l'anticòs pont ADVANCE HRP Link durant 30 minuts
18. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
19. Eliminar el tampó de rentat

20. Incubar amb l'anticòs secundari marcat ADVANCED HRP Enzyme durant 30 minuts
21. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
22. Eliminar el tampó de rentat
23. Revelar la peroxidasa amb DAB+ durant 2-4 minuts
24. Rentar amb aigua desionitzada
25. Seguir amb una tinció d'hematoxilina

Per a la sonda:

- **Solució STOCK:** afegir 90 µl d'aigua als 10 µl de la sonda comercial
- **Solució d'ús:** dilució 1:00 de la solució STOCK en aigua desionitzada

9. Extracció d'ADN de cèl·lules

Partirem d'un pellet de les cèl·lules del nostre interès, rentades prèviament amb PBS. L'extracció es fa mitjançant el kit "DNeasy Blood and Tissue kit" de Qiagen (REF: 69506).

1. Afegir 200 µl de sèrum salí
2. Afegir 20 µl de la proteasa del kit
3. Afegir 200 µl del Buffer AL
4. Fer un vòrtex fort de 15 segons (ha de quedar una barreja homogènia)
5. Incubar a 56°C durant 15 minuts
6. Centrifugar 30 segons a 10000 rmp
7. Afegir 200 µl d'etanol 100%
8. Fer un vòrtex fort de 15 segons
9. Centrifugar 30 segons a 10000 rmp
10. Pipetejar amb cura per barrejar i passar la barreja a una columna
11. Centrifugar 1 minut a 8000 rpm
12. Descartar el líquid del tub col·lector
13. Afegir 500 µl del Buffer AW 1
14. Centrifugar 1 minut a 8000 rpm
15. Descartar el líquid del tub col·lector
16. Afegir 500 µl del Buffer AW 2
17. Centrifugar 3 minuts a 14000 rpm
18. Descartar el líquid del tub col·lector
19. Centrifugar la columna buida a màxima velocitat
20. Passar la columna a un tubet d'1.5 ml
21. Afegir 100 µl buffer AE o aigua destil·lada (el volum dependrà de la mostra i a la concentració a la que la vulguem)
22. Incubar a TA 1-5 minuts
23. Centrifugar 1 minut a 8000 rpm
24. Quantificar
25. Fer servir o congelar a -20°C

10. Methyl-Specific PCR (MSP)

La MSP s'utilitza per determinar l'estat de metilació d'un gen, en el nostre cas els miRNAs seleccionats. Abans s'ha de realitzar un tractament amb bisulfit que converteix les citosines metilades de les illes CpG en uracils, de manera que, amb primers específics es pot determinar aquest canvi.

Tractament amb bisulfit (EZ DNA Methylation-Gold Kit de Zymo Research)

- Preparar el CT conversion reagent dins del propi vial
 - 900 µl d'H₂O_{dd}
 - 300 µl d'M-Dilution buffer
 - 50 µl d'M-Dissolving buffer

} Barrejar a TA durant 10 minuts amb el vòrtex
- Afegir etanol 100% al M-Wash buffer
- Afegir 130 µl de CT conversion reagent a un tubet de 200 µl on hi hagi 20 µl amb el DNA a tractar
- Posar el tubet al termociclador amb les següents condicions:
 - 98°C → 10 minuts
 - 64°C → 2 hores i 30 minuts
 - 4°C
- Afegir 600 µl d'M-Binding buffer a una de les columnes subministrades pel kit
- Carregar la mostra a la columna
- Tapar i barrejar per inversió varis cops
- Centrifugar a màxima velocitat (>10.000 g) durant 30 segons
- Descartar el filtrat
- Afegir 100 µl d'M-Wash buffer
- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons
- Afegir 200 µl de M-Desulphonation Buffer i deixar incubar a TA durant 15-20 minuts
- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons
- Afegir 200 µl de M-Wash buffer
- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons
- Afegir 200 µl de M-Wash buffer
- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons
- Col·locar la columna a un tubet d'1.5 ml
- Afegir 10 µl d'M-Elution buffer

- Centrifugar a màxima velocitat durant 30 segons
- Quantificar el DNA

Millor fer aquest pas el dia que es vulgui utilitzar l'ADN ja que se'n recupera poquet i és molt susceptible a fer-se malbé.

MSP

Màster x1	Vf: 20 µl
dNTPs	2 µl
buffer	2 µl
MgCl ₂	0.8 µl
TaqGold	0.5 µl
H ₂ O _{dd}	9.7 µl
PF	1 µl
PR	1 µl
ADN	150 ng en 3 µl

- 95°C → 10 segons
 - 95°C → 30 segons
 - 55-60°C → 30 segons
 - 72°C → 1 minut
 - 72°C → 7 minut
- } 40 cicles

Les temperatures d'*annealing* varien per cada parell de primers.

Gel d'agarosa

Per poder veure si el nostre ADN s'ha amplificat o no, realitzarem un gel d'agarosa a l'1% tenyit amb bromur d'etidi (BrEt), que sota el transil·luminador ens mostrarà les bandes.

11. MSP *in situ*

Passos previs

- Línies cel·lulars: estendre 10 µl d'una solució a 500000 cèls/ml sobre un portaobjectes recobert amb *bind-silane* i deixar assecar a TA 1h
- FFPEs: col·locar dos/tres talls per vidre sobre un portaobjectes recobert de *bind-silane* i desparafinar (a mà o a màquina) i deixar assecar a TA 1h

Cal fer un mínim de dos vidres per mostra, ja que un ens servirà com a control negatiu.

Preparació de la mostra

1. Tractament amb calor 105°C 100 segons
2. Afegir aigua oxigenada per inhibir la peroxidasa endògena → Incubar ON a 37°C
3. Fixació amb PFA al 4% en PBS (pH de 7.4) → 4h a TA
4. 10 min en PBS 3x (agitació periòdica en vertical)
5. 1 rentat d'1 minut en aigua destil·lada
6. Assecar a l'aire durant 1 h
7. Tractament amb proteïnasa K (6 µg/ml) dissolta en PBS
8. Limfòcits → 5-10 min a 25°C
Teixit parafinat → 15-30 min 25°C (a determinar segons el tipus de teixit)
9. Incubar a 95°C 2 minuts per inhibir la proteasa
10. Rentar 10 segons amb PBS i després 10 segons en aigua destil·lada
11. Deixar assecar a l'aire durant 1 h

Bisulfit

12. Rentat amb tampó DAKO
13. Esbandir el tampó amb NaOH 0.2M
14. Eixugar el vidre
15. Submergir en NaOH 0.2 M a 37°C durant 10 minuts
16. Treure de l'incubador i eixugar el vidre
17. Posar un marc adhesiu que contingui tant teixit/cèl·lules com sigui possible
18. Posar la solució del bisulfit dins el marc (que quedi ple) i tapar amb el cobreobjectes vigilat de no deixar cap bombolla:

Solució de bisulfit	Solució de treball
NaOH 0.2 M	50 µl
Bisulfit 3 M	30 µl
Hidroquinona 10 mM	500 µl

19. Posar a la cambra humida:

- 2 minuts a 95°C
- 15 hores a 50°C

20. Parar l'aparell i deixar refredar a dins

21. Rentar amb aigua corrent 2 minuts

22. Rentar amb etanol 100% 1 minut

23. Deixar assecar a l'aire

PCR (col·locar al termociclador el bloc especial per a portaobjectes)

Prepararem 2 màsters, una amb els primers i una sense aquests, que utilitzarem com a control.

La farem amb els mateixos volums que la posada a punt per la reacció en tubets. Volum final de 25 µl per cada caixeta.

Màster x1	Vf: 25 µl
buffer	2.5 µl
MgCl ₂	1 µl
dNTPs	2.5 µl
PF	1.25 µl
PR	1.25 µl
TaqGold	0.625 µl
H ₂ O _{dd}	15.875 µl

- 95°C → 10 min
 - 95°C → 2 min
 - 55-60°C → 1 min 30 segons
 - 72°C → 1
- } 25 cicles

Post PCR

24. Buidar el contingut de la caixa (10-15 µl)
25. Escalfar a 92°C durant 1-2 minuts per immobilitzar les sondes
26. 2 rentats de 5 minuts amb 2xSSC (saline-sodium citrate) a TA

Rentats

27. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5-10 minuts en agitació
28. Eliminar el tampó de rentat

Bloqueig de la peroxidasa endògena

29. *Peroxidase block DAKO* durant 10 minuts
30. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
31. Eliminar el tampó de rentat

Incubació amb anti-FITC i revelat

32. Incubar amb l'anticòs primari de ratolí- α biotina (els primers hi estan marcats) durant 1 hora
33. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
34. Eliminar el tampó de rentat
35. Incubar amb l'anticòs pont ADVANCE HRP Link durant 30 minuts
36. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
37. Eliminar el tampó de rentat
38. Incubar amb l'anticòs secundari marcat ADVANCED HRP Enzyme durant 30 minuts
39. Rentar amb *DAKO Wash Buffer* 5 minuts en agitació
40. Eliminar el tampó de rentat
41. Revelar la peroxidasa amb DAB+ durant 2-4 minuts
42. Rentar amb aigua desionitzada
43. **Seguir amb una tinció d'hematoxilina**

12. Microfluídiques

Per tal de realitzar el perfil de miRNAs utilitzarem “TaqMan Array Human MicroRNA Set Cards v2.0” (Applied Biosystems, FosterCity, CA). Aquest mètode es caracteritza per la RT-PCR múltiplex que permet detectar 670 miRNAs madurs humans. Per una placa o array utilitzarem els següents volums:

1 mostra	Vf: 4.5 µl
10x RT Buffer	0.8 µl
dNTPs	0.2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ml)	1.5µl
RNase Inhibitor (20 U/ml)	0.1 µl
Megaplex RT primers (10x)	0.8 µl
MgCl2 (20 U/ml)	0.9 µl
ARN total	500 ng en 200 µl

Condicions de reacció:

- 2 minuts → 16°C
 - 1 minut → 42°C
 - 1 segon → 50°C
 - 5 minuts → 85°C
- } 40 cicles

A continuació realitzarem la PCR quantitativa a temps real en una ABI7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems), amb el capçal especial per a plaques microfluídiques. D'aquesta màster mix es carreguen 100 µl a cada un dels carrils.

1 placa	Vf: 900 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix No Amperase (10x)	450 µl
Producte de la PCR Megaplex RT	6 µl
H₂O_{dd}	444 µl

Carreguem la placa i posem a córrer la placa utilitzant les condicions per defecte del “384 well TaqMan Low Density Array”. El programa dura, aproximadament, dues hores.

13. Tractament amb 5-Aza-dC

La decitabina, o el 5-Aza-dC, és un agent desmetilant. El tractament de les cèl·lules amb aquest fàrmac ens permetrà veure quins miRNAs es reexpressen. Això indicarà que aquests poden estar regulats per metilació:

- Semblar 5 milions de cèl·lules en 25 ml de medi en un flascó gran
 - L-428, L-1236 i HD-MY-Z en RPMI amb FBS al 10%
 - L-540 en RMPI amb FBS al 20%
- Deixar-les reposar 24 hores
- Afegim a les cèl·lules 5-Aza-dC a la concentració desitjada o amb DMSO (control)
- Deixar reposar 24 hores
- Rentar les cèl·lules i resuspendre-les amb medi fresc sense 5-Aza-dC
- Deixar reposar 72 hores
- **Extracció d'ARN** (veure protocol detallat)

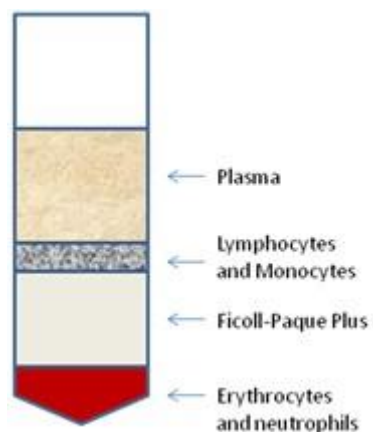
Com a control, hem utilitzat els nivells d'expressió del CD19, un marcador específic de cèl·lula B, que en el LH se sap que està metilat.

14. Aïllament de cèl·lules B

Quan s'estudien les cèl·lules HRS el control ideal seria utilitzar cèl·lules B de centre germinal. Com que són difícils d'aconseguir, el millor control que vam poder obtenir van ser les cèl·lules B presents en la sang. Per aconseguir un nombre suficient de cèl·lules vam ajuntar mostres de tres controls sans després de realitzar el Ficoll.

Ficoll (separació de les cèl·lules mononucleades circulants en sang perifèrica)

1. Centrifuguem el vial amb sang durant 10 minuts
2. Extraïem el sèrum i el congelem
3. Afegim PBS fins a la part superior de l'etiqueta i barregem bé
4. En un tub de 15 ml amb 2.5 ml de Ficoll hi afegim la barreja amb molta cura vigilant que quedin dues fases ben diferenciades
5. Centrifugar 20 minuts a 2000 rpm (acceleració i frenada molt lentes)



6. Agafar amb cura l'anell de cèl·lules mononucleades (limfòcits i monòcits) amb una pipeta Pasteur i posar-les en un altre tub.
7. Afegir PBS a les cèl·lules mononucleades fins a 10 ml
8. Centrifugar 5 minuts a 1500 rpm
9. Descartar el sobrenedant
10. Resuspendre el pellet el 1 ml de PBS i afegir-ne 9 més
11. Afegir PBS a les cèl·lules mononucleades fins a 10 ml
12. Centrifugar 4 minuts a 1500 rpm
13. Descartar el sobrenedant

Aïllament de les cèl·lules B

1. Rentat amb PBS
2. Centrifugar a 300 g durant 10 minuts
3. Descartar el sobrenedant
4. Resuspendre les cèl·lules en 100 µl de *running buffer*
5. Afegir 25 µl de *B-cell Biotin-Antibody Cocktail*
6. Barrejar i deixar-ho 10 minuts a la nevera
7. Rentar amb 5 ml de *running buffer*
8. Centrifugar a 300 g durant 10 minuts
9. Descartar el sobrenedant
10. Afegir 200 µl de *running buffer*
11. Afegir 50 µl d'*Anti-Biotin MicroBeads*
12. Barrejar i deixar-ho incubar 15 minuts a la nevera
13. Rentar amb 5 ml de *running buffer*
14. Centrifugar a 300 g durant 10 minuts
15. Descartar el sobrenedant
16. Resuspendre en 4 ml de *running buffer*
17. Passar la suspensió per l'AutoMacs Separator → programa "deplete"
 - a. Fracció + → cèl·lules no-B
 - b. Fracció - → cèl·lules B

Nota: durant aquest procés es perden gairebé la meitat de les cèl·lules inicials